



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
Programa: Patología de los tumores humanos (285B)

**Impacto de la variación en el número de copias y
del estado de metilación de genes supresores de tumor
en las vías de progresión del meningioma**

Tesis doctoral

Memoria que, para aspirar al título de Doctora, presenta:

Teresa San Miguel Díez

Dirigida por:

Dra. Rosario Gil Benso

Dra. Concepción López Ginés

Dr. Miguel Cerdá Nicolás

Valencia 2015

Dra. Rosario Gil-Benso, Catedrática de Universidad en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Dra. Concepción López-Ginés, Catedrática de Universidad en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Dr. Miguel Cerdá-Nicolás, Catedrático de Universidad en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Facultativo Especialista en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICAN QUE

La presente tesis doctoral “Impacto de la variación en el número de copias y del estado de metilación de genes supresores de tumor en las vías de progresión del meningioma” ha sido realizada por Teresa San-Miguel Díez en el departamento de Patología de la Universitat de València bajo nuestra dirección, y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

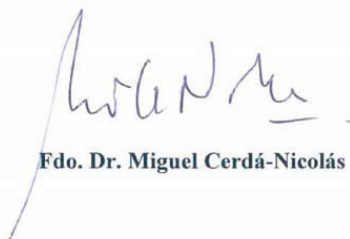
Y para que así conste, firman este certificado en Valencia, a 1 de Septiembre de 2015.



Fdo. Dra. Rosario Gil-Benso



Fdo. Dra. Concepción López-Ginés



Fdo. Dr. Miguel Cerdá-Nicolás

AGRADECIMIENTOS

Son incontables las personas que me han ayudado en estos años, tanto en el ámbito profesional como en el personal; a todos ellos les estaré siempre agradecida:

A mis directores de tesis, por acogerme, los doctores Rosario Gil-Benso, Concha López-Ginés y Miguel Cerdá-Nicolás, por guiarme, por ayudarme a construir mi camino y por darme fuerzas para no desistir ante las adversidades en la investigación.

Al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la UV, al completo. De manera especial a los/as compañeros/as por su apoyo dentro y fuera del laboratorio, Lara Navarro entre otras cosas por su incommensurable paciencia, Bea Sánchez, Gema, Marta Piqueras, cuyos abrazos por el pasillo nunca tendrán parangón, Ana Pellín, Eva Villamón, Irene Tadeo, Ana Berbegall, Susana, Maite, Victor, Lisandra y Eli. Especialmente al Dr. Rafa Benito por ser mi primer maestro en este lugar y un gran amigo. Y a Amparo Andrés, por el breve pero maravilloso tiempo que pasamos juntas. Siempre nos quedará París.

A los profesores de la unidad de Biología, Javier Boix, Mariela Gregori, Antonio Pellín y especialmente a Robert Callaghan, por su disposición constante a ayudarme a compatibilizar mis obligaciones. A mis compañeros asociados, Javier Megías, Eva Serna, Silvia Calabuig y Daniel Monleón, por la comprensión y el apoyo que nos regalamos.

También a todos los profesores del departamento, y muy especialmente, al PAS, a Ana Clari por ser excepcional, al personal de Secretaría, Manolo Pino y Vicen Beltrán, siempre dispuestos y resolutivos, a José Benavent, por todo lo que me ha enseñado, a Teresa y a Merche.

Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico al completo: a todos los médicos, técnicos y demás personal, por su apoyo, por su ayuda y por su inestimable paciencia. Especial mención merecen Bruno, María y Laura por esas tardes compartidas, a Pedro y Pilar y a todos los demás miembros del servicio. También a todos y cada uno de los residentes con los que he coincidido en estos

años: Liria, Paco, Andrea, Mari, Jaime, Carol, María, Marcos, Mauricio, Víctor, Vero etc. Seguro que me dejo alguno, porque habéis sido muchos. Y muy especialmente, a Nuria Santonja.

También a los que hemos compartido menos tiempo pero no por ello menos intenso, Bea Ferrando, Andrés Laguna, Benjamín Domingo y Marina Meri.

A mi comité de sabias, Sara, Marta, Irene, Elvira y Ángela. A mis niñas Laura, Diana y Rebeca. A mis queridos Paco, Fran, Ka, Álvaro y también a Cremades por esos cafés. Lo que me habéis aguantado estos años. A Begotxu, "por todo". A Vero por nuestro principio. A Juanvi y a Nika. A Pedro Pérez-Bermúdez e Isabel Gavidia, por iniciarme en la investigación. A Javier Claver, por enamorarme de las ciencias. A Salva Monje, a Valeriano y a todos los maestros que han pasado por mi vida, desde el colegio hasta esta facultad, pasando por Burjasot.

A Samuel Navarro y Alejo Sempere, más aún por lo personal. A los servicios de Neurocirugía del IVO y del HCUV por cuidar de mi madre desde hace más de 15 años y a los de Cirugía General y Oncología del HCUV por cuidar de mi padre los últimos tiempos. Sin ellos, este proyecto, ni habría empezado, ni habría acabado.

A mi familia.

Este trabajo ha sido financiado mediante el programa de investigación de excelencia Prometeo, Proyecto 11/83 y el programa propio de la Universitat de València de ayudas a la investigación, Beca V Segles para la formación de Personal Investigador 2009.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	4
1.1 EPIDEMIOLOGÍA	4
1.2 PRESENTACIÓN CLÍNICA	5
1.3 TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN	6
2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	8
2.1 MACROSCOPÍA	8
2.2 CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA	8
2.3 CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA	10
2.4 GRADO HISTOPATOLÓGICO.....	11
2.5 LA RECIDIVA TUMORAL	13
3 ALTERACIONES CITOGENÉTICAS EN EL MENINGIOMA	13
3.1 CAMBIOS ASOCIADOS AL CROMOSOMA 22	16
3.2 CAMBIOS ASOCIADOS AL CROMOSOMA 1	17
3.3 CAMBIOS ASOCIADOS AL CROMOSOMA 14	18
3.4 OTROS CAMBIOS CROMOSÓMICOS EN MENINGIOMAS.....	19
4 ALTERACIONES MOLECULARES EN EL MENINGIOMA	22
4.1 GENES ASOCIADOS AL CROMOSOMA 22.....	22
4.1.1 <i>El gen NF2 y su relación con la tumorigénesis del meningioma.</i>	22
4.1.2 <i>Otros genes relacionados con la iniciación tumoral situados en el cromosoma 22</i>	25
4.2 GENES LOCALIZADOS EN EL CROMOSOMA 1	27
4.3 OTROS <i>LOCi</i> GÉNICOS IMPLICADOS EN EL MENINGIOMA.....	28
5 ALTERACIONES EPIGENÉTICAS EN EL MENINGIOMA	31
6 VIAS DE SEÑALIZACIÓN EN MENINGIOMAS	34
7 MENINGIOMAS BENIGNOS Y CAMBIOS GENÉTICOS DESFAVORABLES	36
8 AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
1 HIPÓTESIS	45
2 OBJETIVOS	46
MATERIAL Y MÉTODOS	47
1 ESTUDIO CLÍNICO	49
2 MÉTODOS	52
2.1 RECOGIDA DE MUESTRAS	52
2.2 TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS.....	52
2.3 CONSTRUCCIÓN DE MICROMATRICES TISULARES O <i>TISSUE MICRO ARRAYS (TMAs)</i>	53
2.4 VALORACIÓN DEL NÚMERO DE MITOSIS.....	55
2.5 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	55
2.6 ESTUDIO CITOGENÉTICO CLÁSICO. CULTIVO “ <i>IN VITRO</i> ” Y ESTUDIO DEL CARIOTIPO	57
2.6.1 <i>Recogida de muestras para cultivo</i>	57

2.6.2	Procesamiento de las muestras.....	57
2.6.3	Protocolo para el subcultivo (Técnica de Doblaje).....	58
2.6.4	Crioconservación de las células en cultivo.....	59
2.6.5	Descongelación de las células.....	59
2.6.6	Sacrificio celular y preparación de extensiones cromosómicas.....	60
2.6.7	Obtención de Bandas G.....	60
2.7	ESTUDIO DE CITOGENÉTICA MOLECULAR. HIBRIDACIÓN “ <i>IN SITU</i> ” DE FLUORESCENCIA EN NÚCLEOS EN INTERFASE (IFISH).....	61
2.7.1	Protocolo para la iFISH.....	62
2.7.2	Visualización y valoración de las señales fluorescentes observadas.....	65
2.8	TÉCNICAS MOLECULARES.....	66
2.8.1	Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina.....	66
2.8.2	Extracción de ADN de sangre periférica.....	67
2.8.3	Optimización de las muestras de ADN.....	68
2.8.4	Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA).....	70
2.8.5	Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación, específica para secuencias metiladas (MS-MLPA).....	74
2.8.6	Evaluación y valoración de los picos obtenidos: software Coffalyser®.....	78
2.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	80
RESULTADOS.....		83
1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....		85
2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.....		92
2.1	HISTOPATOLOGÍA DE LOS MENINGIOMAS PRIMARIOS.....	92
2.2	HISTOPATOLOGÍA DE LOS MENINGIOMAS RECIDIVADOS.....	98
3 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS.....		100
3.1	CULTIVO “ <i>IN VITRO</i> ”.....	100
3.2	CARIOTIPO.....	101
3.3	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN MENINGIOMAS PRIMARIOS.....	102
3.3.1	Implicación de las alteraciones cromosómicas en función del grado histológico en meningiomas primarios.....	105
3.4	ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN MENINGIOMAS RECIDIVADOS.....	108
3.4.1	Implicación de las alteraciones cromosómicas en función del grado histológico en recidivas de meningioma.....	111
3.5	OTRAS ALTERACIONES CITOGENÉTICAS ENCONTRADAS.....	112
4 ESTUDIOS CITOGENÉTICOS: HIBRIDACIÓN “<i>IN SITU</i>” DE FLUORESCENCIA.....		117
4.1	RESULTADOS DE IFISH EN MENINGIOMAS PRIMARIOS.....	118
4.2	RESULTADOS DE IFISH EN MENINGIOMAS RECIDIVADOS.....	120
5 ESTUDIOS MOLECULARES: AMPLIFICACIÓN DE SONDAS MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGACIÓN (MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION: MLPA).....		122
5.1	ESTADO ALÉLICO DEL GEN NF2 MEDIANTE MLPA.....	122
5.1.1	Análisis del gen NF2 mediante MLPA en meningiomas primarios.....	125
5.1.2	Análisis del gen NF2 mediante MLPA en meningiomas recidivados.....	126
5.2	ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS HALLAZGOS EN EL ESTADO ALÉLICO DEL GEN NF2 POR MLPA Y LA DETERMINACIÓN DE LA REGIÓN 22Q POR TÉCNICAS CITOGENÉTICAS.....	127
5.3	ANÁLISIS DE OTROS <i>LOCI</i> CROMOSÓMICOS EN EL ESTUDIO P044-NF2: 1p34, 2q13, 3p22, 4q27, 14q13 y 15q21.....	128
6 ESTUDIOS MOLECULARES: AMPLIFICACIÓN DE SONDAS MÚLTIPLE DEPENDIENTE DE LIGACIÓN PARA METILACIÓN ESPECÍFICA (MS-MLPA).....		132
6.1	VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS Y ESTADO DE METILACIÓN DE GENES EN MENINGIOMAS PRIMARIOS.....	135

6.1.1	<i>Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en meningiomas primarios en función del grado histológico</i>	138
6.2	VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS Y ESTADO DE METILACIÓN DE GENES EN RECIDIVAS	140
6.2.1	<i>Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en meningiomas recidivados en función del grado histológico</i>	142
6.3	PATRONES GENÉTICO-MOLECULARES DE LOS TUMORES PRIMARIOS FRENTE A LAS RECIDIVAS	144
7 RELACIÓN DE LAS VARIABLES GENÉTICAS ANALIZADAS Y LOS PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS		147
7.1	VARIABLES GENÉTICAS EN RELACIÓN CON LA LOCALIZACIÓN TUMORAL	147
7.2	VARIABLES GENÉTICAS EN RELACIÓN AL SEXO	148
7.3	VARIABLES GENÉTICAS Y KI-67	149
8 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES ANALIZADAS EN LOS TUMORES PRIMARIOS RECIDIVANTES Y NO RECIDIVANTES		150
8.1	VARIABLES CLÍNICAS Y NEUROPATOLÓGICAS	150
8.2	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS IMPLICADAS EN LA TENDENCIA A RECIDIVAR EN MENINGIOMAS PRIMARIOS	151
8.2.1	<i>Variables en citogenética clásica</i>	151
8.2.2	<i>Variables en citogenética molecular (iFISH)</i>	153
8.2.3	<i>Evolución de los meningiomas en relación al estado del gen NF2</i>	154
8.2.4	<i>Evolución de los meningiomas en relación al estado alélico de los loci cromosómicos 1p34, 2q13, 3p22, 4q27, 14q13 y 15q21 incluidos en el estudio P044-NF2</i>	155
8.2.5	<i>Impacto de la VNC y del estado de metilación de genes supresores de tumor en la evolución de los meningiomas</i>	156
8.2.5.1	<i>Evolución de los meningiomas de grado I en función de las VNC y del estado de metilación en genes supresores de tumor</i>	157
8.2.5.2	<i>Evolución de los meningiomas de grado II en función de las VNC y del estado de metilación en genes supresores de tumor</i>	161
DISCUSIÓN		165
1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA RECIDIVA TUMORAL		167
2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE MENINGIOMAS PRIMARIOS Y MENINGIOMAS RECIDIVADOS		170
2.1	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (CARIOTIPO) Y CITOGENÉTICA MOLECULAR (iFISH)	170
2.2	GENES SUPRESORES DE TUMOR EN LOS CROMOSOMAS MÁS FRECUENTEMENTE IMPLICADOS EN LA BIOLOGÍA DEL MENINGIOMA: CROMOSOMAS 22, 1 Y 14	174
2.2.1	<i>Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 22</i>	174
2.2.2	<i>Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 1</i>	177
2.2.3	<i>Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 14</i>	178
2.3	VARIACIÓN EN NÚMERO DE COPIAS Y METILACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA BIOPATOLOGÍA DE LOS MENINGIOMAS, SITUADOS EN DIVERSAS REGIONES CROMOSÓMICAS	178
3 PERFIL GENÉTICO-MOLECULAR EN MENINGIOMAS PRIMARIOS QUE HAN RECIDIVADO FRENTE A MENINGIOMAS QUE NO HAN RECIDIVADO		188
CONCLUSIONES		195
BIBLIOGRAFÍA		199

ABREVIATURAS

aCGH	<i>Array</i> de hibridación genómica comparada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Anatomía Patológica
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBTRUS	Registro central de tumores cerebrales de los Estados Unidos
CCND1	Ciclina D1
CD34	<i>Cluster</i> de diferenciación 34
CEA	Antígeno carinoembriónico
CGH	Hibridación genómica comparada
CIEC	Comité Institucional del HCUV
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
del	Delección
der	Derivado cromosómico
dic	Cromosoma dicéntrico
dmin	Dobles minutos
EMA	Antígeno epitelial de membrana
EMR	Ezrina-moesina-radixina
Fase G1	Fase pre-síntesis de ADN del ciclo celular
Fase G2	Fase de preparación a la mitosis del ciclo celular
Fase M	Fase de mitosis del ciclo celular
Fase S	Fase de síntesis de ADN del ciclo celular
FISH	Hibridación " <i>in situ</i> " de fluorescencia
Gen	
AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 gene</i>
ALPL	<i>Alkaline phosphatase gene</i>
AP1B1	<i>Adaptor-related protein complex 1, beta 1 subunit gene</i>
APC	<i>Adenomatous polyposi coli gene</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated gene</i>
BAM22	<i>Human beta-adaptin gene</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2 gene</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1 gene</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2 gene</i>
CADM1	<i>Cell adhesion molecule 1</i>
CASP8	<i>Caspase 8 gene</i>
CASR	<i>Calcium-sensing receptor gene</i>
CD44	<i>Cluster of differentiation 44 gene</i>
CDH1	<i>E-cadherin gene</i>
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6 gene</i>
CDKN1B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B gene</i>

CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2 A gene</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B gene</i>
CDKN2C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C gene</i>
CELF2	<i>Elav-like family member 2 gene</i>
CHFR	<i>Checkpoint with forkhead and ring finger domains gene</i>
CLH-22	<i>Clathrin, heavy chain-like 1 gene</i>
CREM	<i>cAMP responsive element modulator gene</i>
DAL-1	<i>Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3 gene</i>
DMBT1	<i>Deleted in malignant brain tumors 1 gene</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor gene</i>
ET-1	<i>Endothelin 1 gene</i>
FHIT	<i>Fragile histidine triad protein gene</i>
FOXD2	<i>Forkhead box D2 gene</i>
FOXE3	<i>Forkhead box E3 gene</i>
FOXM1	<i>Forkhead box M1 gene</i>
Gar22	<i>Growth arrest-specific 2 like 1 gene</i>
GLI1	<i>GLI family zinc finger 1 gene</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-transferase P gene</i>
HIC1	<i>Hypermethylated in cáncer gene</i>
HIST1Hic	<i>Histone cluster 1 gen gene</i>
HOX, genes	<i>Genes de la familia Homeobox</i>
IGF2	<i>Insulin growth factor receptor 2 gene</i>
INI1	<i>Integrase interactor 1 gene</i>
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4 gene</i>
KLK3	<i>Kallikrein-Related Peptidase 3 gene</i>
LARGE	<i>Like-glycosyltransferase gene</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1 gene</i>
MLH3	<i>mutL homolog 3 gene</i>
MNI	<i>Meningioma disrupted in balanced translocation gene</i>
MUTYH	<i>mutY homolog gene</i>
MXI1	<i>MAX interactor 1 gene</i>
NDRG2	<i>N-myc downstream-regulated gene 2</i>
NF2	<i>Neurofibromatosis tipo 2 gene</i>
PAH	<i>Phenylalanine hydroxylase gene</i>
PARK2	<i>Parkinson protein 2 gene</i>
PRDX1	<i>Peroxiredoxin 1 gene</i>
PTCH1	<i>Patched homolog 1 gene</i>
PTCH2	<i>Patched homolog 2 gene</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog gene</i>
RAD54L	<i>DNA-dependent ATPase like gene</i>
RARB	<i>Retinoic acid receptor beta gene</i>
RASSF1	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 gene</i>
RRP22	<i>RAS-related protein on chromosome 22 gene</i>
SMARCB1	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1 gene</i>

SMO	<i>Smoothened homolog gene</i>
SPP1	<i>Secreted phosphoprotein 1 gene</i>
SRFP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1 gene</i>
THBS1	<i>Thrombospondin-1 gen gene</i>
TIMP3	<i>Metallopeptidase inhibitor 3 gene</i>
TNFRSF1A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A gene</i>
TP53	<i>Tumor protein p53 gene</i>
TP73	<i>Tumor protein p73 gene</i>
TRAF7	<i>TNF receptor-associated factor 7 gene</i>
TSC2	<i>Tuberous sclerosis 2 gene</i>
TSLC1	<i>Tumor suppressor gene in lung cancer 1</i>
GIST	Tumores del estroma gastrointestinal
HCUV	Hospital Clínico Universitario de Valencia
HE	Tinción Hematoxilina-Eosina
Hh	<i>Hedgehog</i> (vía)
HNPCC	Cancer colorrectal no polipósico
HPF	<i>High-power field</i> . Campo de un objetivo de 40X
hTERT	Telomerasa transcryptasa reversa
iFISH	Hibridación " <i>in situ</i> " de fluorescencia en núcleos en interfase
IGH	<i>Locus</i> de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
IHQ	Inmunohistoquímica
ins	Inestabilidad cromosómica
iso	Isocromosma
LOE	Lesión ocupante de espacio
LOH	Pérdida de heterocigosis
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mar	Cromosoma marcador
Me	Mediana
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> . Amplificación de sondas múltiple dependiente de ligación
mm	Milímetro
MMPs	Metaloproteínas de la matriz
nt	Nucleótidos
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Brazo corto de un cromosoma
PAS	Reacción del ácido peryódico de Schiff
PBS	Solución de fosfato tamponada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
puv	Pulverización de cromosomas
q	Brazo largo de un cromosoma
r	Cromosoma en anillo
Rec	Recidiva
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RM	Resonancia magnética

RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SKY	Cariotipo espectral multicolor
t	Translocación cromosómica
tas	Asociación telomérica
TC	Tomografía computarizada
TGF-β	<i>Tumor Growth Factor beta</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i> , micromatriz tisular
TP	Tumor primario
TSG	Gen supresor de tumor
Vía IGF	Vía del factor de crecimiento insulínico
Vía MAPK	Vía de las protein quinasas activadas por mitógenos
Vía NFKB	Vía del factor de necrosis kappa-B
Vía Wnt	Vía Wingless-Int
VNC	Variación en número de copias

INTRODUCCIÓN

El meningioma es el tumor benigno de localización intracraneal más frecuente en la edad adulta. Ya en 1614 Félix Pasteur había descrito estos tumores, y desde entonces se habían denominado de diferentes maneras: en el siglo XVII se hablaba de “tumores fungosos de la duramadre” y en el XVIII de “tumores vellosos de la aracnoides”. A principios del siglo XX, Harvey Cushing describió estos tumores, con aspecto benigno y origen en las meninges, que no infiltraban el parénquima cerebral y en 1922 definitivamente acuñó el término “meningioma” para referirse a ellos ^(1,2).

Para comprender el origen de estos tumores, es necesario conocer el origen embriológico de su lugar de génesis: las meninges (figura 1). Las meninges se originan a partir del mesénquima derivado de las crestas neurales, constituyendo dos cubiertas, por un lado la paquimeninge, de composición fibrosa formada por la duramadre, y por otro, la leptomeninge de estructura laminar epitelial, constituida por la aracnoides y la pia madre ⁽³⁾. Estas cubiertas presentan un alto grado de compactación, si bien los meningiomas parecen originarse fundamentalmente desde la aracnoides ⁽⁴⁾.

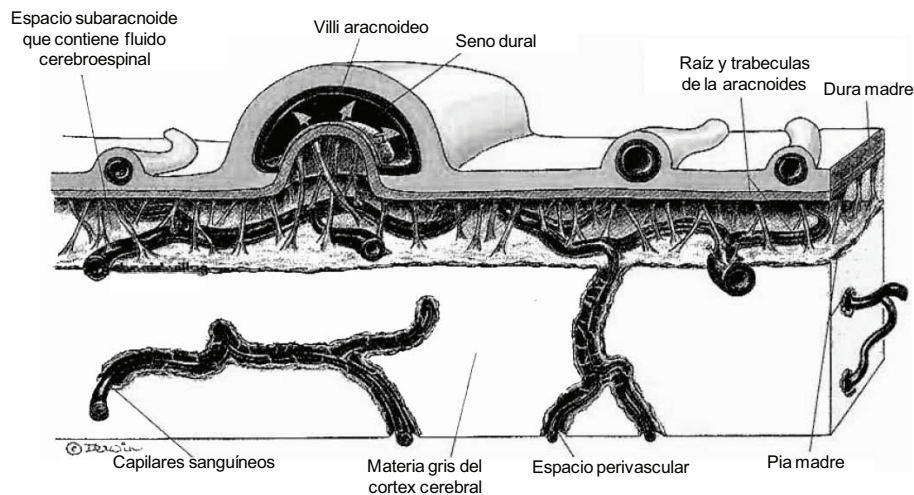


Figura 1. Estructura de las cubiertas meníngeas. Modificado de Essential Histology (5).

1 Características clínicas

1.1 Epidemiología

Según la edición de 2014 del Registro Central de Tumores Cerebrales de los Estados Unidos (CBTRUS), los meningiomas representan el 36,1% de los tumores intracraneales y el 38,1% de los espinales. Esto los sitúa por delante de los gliomas en cuanto a incidencia, con una tasa anual de 7,4 casos nuevos por cada 100000 habitantes ⁽⁶⁾. Si proyectamos este dato sobre la población de nuestra área geográfica, supone la aparición de 59 casos nuevos cada año en la ciudad de Valencia, y en torno a los 370 en el conjunto de la Comunidad Valenciana.

La incidencia de los meningiomas aumenta con la edad: su frecuencia máxima se da entre los 50 y los 70 años, y la edad mediana de debut de la enfermedad se sitúa hacia los 65 años. Los meningiomas infantiles son muy infrecuentes ya que suponen tan solo entre un 0,4 y 4,6% de los tumores del sistema nervioso central en pacientes menores de 16 años ⁽³⁾.

Con respecto a la distribución por sexos, el predominio femenino es patente, con un ratio mujer/hombre que se sitúa entre 2:1 y 3:1 en la mayoría de series ⁽⁶⁻⁸⁾. En los tumores espinales la frecuencia en mujeres es mayor aún, alcanzando ratios 10:1 ⁽⁹⁾. La incidencia femenina de los meningiomas está aumentando en los últimos años; se ha sugerido que este aumento podría estar relacionado con el uso de tratamientos hormonales en mujeres postmenopáusicas, aunque no se ha encontrado asociación con la utilización de anticonceptivos hormonales en mujeres jóvenes ⁽⁷⁾. Cabe destacar que esta predominancia femenina deja de ser evidente en meningiomas agresivos ^(10,11) y tampoco existe en los meningiomas infantiles ⁽¹²⁾. A diferencia de otros tumores del sistema nervioso central, los meningiomas son más frecuentes en población negra, con un ratio 1,3:1 sobre la blanca ^(6,13).

El papel hormonal en la génesis del meningioma es objeto de intenso estudio. Además de la elevada incidencia femenina, se ha visto que el aumento en los niveles de progesterona durante el embarazo, acelera la aparición de sintomatología y lleva al debut de la enfermedad. Por otra parte, se ha referido una posible asociación entre meningioma y cáncer de mama ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Aparte del efecto hormonal, numerosos estudios postulan múltiples factores de riesgo asociados a la génesis de los meningiomas, que

abarcan desde aspectos meramente ambientales, como pueden ser los derivados de la ocupación profesional, hasta factores genéticos concretos ⁽³⁾. El más universalmente contrastado es el traumatismo craneoencefálico, ya descrito en la obra de Cushing ^(2,17). La exposición a radiaciones también parece estar implicada en el desarrollo de estos tumores, pues en diferentes series se ha encontrado un riesgo incrementado en personas que sufrieron exposiciones directas a radiaciones ionizantes⁽¹⁸⁾; de hecho, se postula incluso el efecto de exposiciones localizadas o a bajas dosis, de manera repetida, como ocurre en los tratamientos radioterápicos o en las exploraciones con rayos X ⁽¹⁹⁾.

Hay que señalar que a pesar de ser tumores generalmente esporádicos, el factor genético más destacado es la Neurofibromatosis de tipo 2; estos pacientes, además de un riesgo incrementado de desarrollar meningiomas, presentan meningiomas múltiples en cerca del 8% de los casos ⁽²⁰⁾, fenómeno que no alcanza el 2% en el resto de afectados de meningiomas ⁽²¹⁾. Esta relación no se da en pacientes con Neurofibromatosis tipo I. También se ha asociado a otros síndromes genéticos, como los de Gorlin, Cowden, Li-Fraumeni, Turcot/Gardner o la enfermedad de Von Hippel-Lindau, en los que los pacientes presentan meningiomas, aunque con menor frecuencia que en la Neurofibromatosis de tipo 2 ⁽⁴⁾.

1.2 Presentación clínica

Los meningiomas son tumores que crecen de manera localizada y superficial. El signo más frecuente es la hipertensión endocraneal ocasionada por el efecto masa, que suele llevar asociada un cuadro clínico que incluye cefalea, vómitos y parestesias. Es la cefalea de larga evolución, el síntoma que con más frecuencia lleva al paciente a la consulta médica y, por tanto, al diagnóstico de la patología.

Con el crecimiento, estos tumores comprimen las estructuras adyacentes y la sintomatología que producen deriva, en consecuencia, de esta compresión. Dado que los meningiomas pueden originarse a lo largo de toda la cubierta meníngea, los síntomas varían dependiendo de su localización. La ubicación más frecuente es la convexidad de los lóbulos cerebrales; habitualmente son tumores parasagitales asociados con la hoz del cerebro y el seno venoso. En estos casos es habitual la alteración de las funciones psíquicas superiores, asociadas o no a hipertensión endocraneal. Con menor frecuencia se sitúan en la base craneal anterior, donde cabe destacar los tumores del quiasma

óptico, que generan trastornos de la visión. En las neoplasias de la fosa posterior, es frecuente la afectación de los pares de nervios craneales, y con especial mención, la afectación del VIII par, que se caracteriza por pérdida de audición; también pueden ocasionar alteraciones motoras ^(3,22). Localizaciones intraventriculares o epidurales son muy poco frecuentes y en ellas es habitual la hidrocefalia. Los tumores del raquis suelen cursar con paresias y alteraciones sensitivas, síntomas que hacen que su detección clínica sea más rápida ^(23,24).

El diagnóstico radiológico mediante tomografía computarizada (TC) muestra los meningiomas como lesiones hiperdensas, de morfología redondeada o lobulada y con contornos bien definidos, que alcanza la superficie de la duramadre; ésta, suele mostrar un engrosamiento en la porción que contacta con el tumor, llamada cola dural. Con frecuencia se asocian a edema peritumoral y en ocasiones muestran calcificaciones. La TC permite caracterizar mejor las calcificaciones mientras que la extensión del edema se determina mejor con resonancia magnética (RM) ⁽²⁵⁾. Sin embargo, el diagnóstico definitivo se establece mediante el estudio histopatológico del tumor, tras su resección quirúrgica.

1.3 Tratamiento y evolución

El abordaje terapéutico de los meningiomas depende de factores relaciones con el paciente (edad y situación clínica), y de factores relacionados con el tumor (localización y tamaño), pero en general, el tratamiento de elección es la resección quirúrgica de la lesión, ya que se trata de tumores habitualmente bien delimitados en los que se logra la curación con este método ⁽²⁵⁾. Aunque el diagnóstico definitivo se establece mediante criterios histopatológicos ⁽⁴⁾, cabe mencionar que las mejoras en las técnicas de diagnóstico radiológico permiten un diagnóstico más temprano y preciso en cuanto a las estructuras implicadas y, en consecuencia, un mejor abordaje quirúrgico ⁽²⁵⁾.

Los avances en las técnicas neuroendoscópicas han logrado que tumores antes inoperables, como eran los meningiomas de la base craneal, sean ahora con frecuencia, completamente resecables de manera menos invasiva ⁽²⁶⁾, aunque se encuentren en una localización compleja. Dentro de esta localización, y en particular, los tumores que se originan en la región esfenoidal, suelen presentar patrones de crecimiento que favorecen la invasión y destrucción de las estructuras óseas circundantes, con

implicación del seno cavernoso, la órbita, y tejidos blandos extracraneales, lo que dificulta su resección y propicia, por tanto, un peor pronóstico ^(27,28).

La complicación más habitual en los pacientes con meningioma es la aparición de recidivas; se trata de un evento ya descrito por Cushing a principios del siglo XX ⁽²⁹⁾. Aunque los meningiomas se consideran tumores habitualmente benignos, encapsulados y de crecimiento lento, que son curables mediante cirugía radical, en torno a un 20-25% recidivan en un plazo de 10 años ⁽³⁰⁾. Este dato es particularmente importante ya que, a pesar de que el porcentaje de recidivas no es muy grande, en números absolutos, implica a muchos pacientes. El riesgo de recidiva compromete la esperanza de vida de los afectados a causa de las posibles complicaciones secundarias a una nueva intervención quirúrgica, condicionando su calidad de vida.

La extensión de la resección quirúrgica es el principal factor pronóstico en el meningioma. En base a esto, Simpson elaboró una clasificación ⁽³¹⁾ según la cual se establecen 5 grados:

- Grado I: resección macroscópicamente completa del tumor con eliminación de la dura afectada y del hueso subyacente.
- Grado II: resección macroscópicamente completa con coagulación de la dura afectada.
- Grado III: resección macroscópicamente completa sin extirpación de la dura afectada o del hueso subyacente.
- Grado IV: resección subtotal del tumor.
- Grado V: descompresión con o sin biopsia.

La consecución de un grado I o II se considera cirugía radical del tumor y se relaciona con un pronóstico favorable, con tasas de curación del 91 al 95% en resecciones de grado I y del 82 al 85% en grado II. Por el contrario, los grados superiores se alejan de la resección completa y se asocian con una disminución en la tasa de curación, que queda en torno al 71% de los casos ^(31,32). Hasta la actualidad, numerosos trabajos han apoyado la utilidad de esta clasificación en la predicción del desarrollo de recidivas tumorales ⁽³¹⁻³³⁾. No obstante, existen localizaciones, como es el caso de los tumores de la base del cráneo, concretamente los del esfenoides y la fosa olfatoria, que presentan tasas de recidiva superiores, independientemente del grado de resección logrado. Por último,

cabe mencionar los meningiomas malignos, que suponen aproximadamente un 2% de todos los meningiomas, presentan un curso clínico más agresivo y una mayor tasa de recidivas independientemente de otros factores pronósticos.

2 Características histopatológicas

2.1 Macroscopía

El tamaño de los meningiomas en el momento del diagnóstico puede variar enormemente, desde tumores de menos de 1 cm hasta meningiomas que superan los 10 cm en su diámetro mayor. Esto es consecuencia de que los síntomas deriven de la compresión de las estructuras adyacentes, de manera que, dependiendo de la localización y de la dirección de crecimiento del tumor, la sintomatología aparecerá antes o después, y esto, a su vez, se traducirá en masas de mayor o menor dimensión (3,34-36). Es habitual que los tumores más pequeños correspondan a hallazgos casuales por exploraciones radiológicas para otros problemas de salud. La consistencia de las lesiones puede variar desde suave a bastante firme. La firmeza aumenta si hay abundancia de cuerpos de psamoma y, en ocasiones, la presencia de calcificaciones requiere de una hidrólisis ácida suave para mejorar la calidad de las secciones (3). Macroscópicamente, las secciones histológicas del meningioma típico tienen una coloración marrón claro. Este color puede alterarse hacia más amarillento si abundan macrófagos lipidizados en la muestra, o hacia rojizo por la presencia de áreas hemorrágicas (3).

2.2 Clasificación morfológica

Los meningiomas adoptan una amplia variedad de características histológicas. Las primeras descripciones recogían más de 20 tipos de patrones morfológicos (2), si bien la última clasificación de los tumores del Sistema Nervioso Central elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), recoge hasta 16 subtipos histológicos (4) cuyas características principales se describen brevemente a continuación:

- Meningotelial: Células en nidos lobulillares con núcleos ovalados, centrales y presencia de pseudoinclusiones.
- Fibroblástico: Células fusiformes en una matriz rica en colágeno y reticulina, con núcleos estrechos y alargados.
- Transicional: Mezcla de características meningoteliales y fibroblásticas en diferente proporción.
- Psamomatoso: Abundancia de acumulaciones de calcio, colágeno y hierro, que forman los llamados cuerpos de psamoma.
- Angiomatoso: Crecimiento estructurado en función de la vascularización. Los vasos presentan la pared más gruesa y/o esclerosada.
- Microquístico: Células alargadas con estroma mucinoso, citoplasmas claros y vacuolados. Es un patrón compartido con otras histologías.
- Secretor: Presenta inclusiones eosinofílicas hialinas PAS-positivas. Son tumores con apariencia meningotelial.
- Rico en linfoplasmocitos: Caracterizado por presentar infiltrado linfoplasmocítico, y con histología tipo meningotelial.
- Metaplásico: Muestran marcada diferenciación mesenquimal (mixomatoso, mixoide, xantomatoso etc.).
- Cordoide: Células organizadas en trabéculas con citoplasmas vacuolados sobre una matriz mixoide.
- De células claras: Citoplasmas grandes y claros por acumulación de glucógeno, positivas a la reacción de PAS. No presentan un patrón definido de crecimiento y combinan estas características con otras morfologías. Afecta a pacientes más jóvenes.
- Atípico: Tumores que cumplen los criterios de malignidad de aumento en el recuento de mitosis, aumento en la celularidad, ratio núcleo-citoplasma elevado, prominencia nucleolar, patrón de crecimiento continuo o en hoja y necrosis.
- Papilar: Presencia focal de arquitectura papilar y cores fibrovasculares.
- Rabdoide: Crecimiento en hoja. Células con núcleos excéntricos, nucléolos prominentes y citoplasmas con inclusiones eosinofílicas.

- Anaplásico: Características similares al atípico pero con un gran incremento en figuras mitóticas (mayor a 20 en 10 campos a 40x). Se caracteriza por la disminución de la supervivencia en los afectados.
- Otros: Patrones que no encajan en el esquema de la OMS. Tumores de células gigantes, meningiomas esclerosantes, u oncocíticos entre otros.

En cuanto a la frecuencia de estos subtipos, el 63% de los meningiomas muestran histología meningotelial, lo que los hace con diferencia los más frecuentes. Otros patrones habituales son el transicional, que representa al 19% de los meningiomas o el fibroblástico con el 13%. El subtipo psamomatoso supone el 2% de estos tumores y las demás variantes en conjunto, no superan el 3% de los meningiomas ⁽³⁷⁾.

2.3 Caracterización inmunohistoquímica

La elevada cantidad de filamentos intermedios presentes en estos tumores hace que sean positivos para la expresión de vimentina ^(4,38). También es habitual la expresión del antígeno epitelial de membrana (EMA) ^(4,38). Con menor frecuencia y de manera focal, expresan la proteína S-100, la enolasa neuronal específica y el antígeno Leu-7 ^(39,40). Concretamente en meningiomas secretores, los anticuerpos anti CEA y anti CK son patentes en los cuerpos de pseudopsamoma típicos de este subtipo y en las células circundantes ^(4,25,41,42).

La predominancia femenina de los meningiomas ha llevado desde hace más de veinte años al estudio de la expresión hormonal y de sus receptores en estos tumores ^(14-16,43-52). Se postula la influencia de los niveles de progesterona en el empeoramiento de los síntomas en situaciones como son el embarazo o la menstruación ^(14-16,53). Dos tercios de los meningiomas expresan receptores de progesterona y andrógenos, y los meningiomas receptor de estrógenos-positivos han demostrado una menor tendencia a recidivar ^(47-49,52). De manera análoga, la ausencia de expresión del receptor de progesterona, acompañada o no de expresión del receptor de estrógenos, se considera un signo de mal pronóstico ^(50,51); no obstante, todavía no se ha logrado una terapia hormonal acertada para los meningiomas. Este hecho enfatiza la importancia de evaluar los marcadores hormonales en situaciones en que su perfil de expresión se encuentra modificado, como es el caso de pacientes con cáncer de mama u otras enfermedades ginecológicas ⁽⁴³⁾.

2.4 Grado histopatológico

Hasta el año 2000 la agresividad en el meningioma se identificaba con los términos “tumores benignos, atípicos y anaplásicos”. La OMS propició el cambio de terminología a grados I, II y III, para definir su agresividad en base a la utilización de una asociación compleja de criterios de malignidad (tabla 1); estos criterios tratan de predecir la disposición a recidivar de los meningiomas; incluyen la presencia de hiper celularidad, la pérdida de la arquitectura normal del tejido, el pleomorfismo nuclear, la prominencia nucleolar, el elevado índice mitótico, la presencia de necrosis, y la invasión del tejido cerebral adyacente ^(4,54). Así, los meningiomas más comunes, que crecen lentamente y tienen un comportamiento habitualmente benigno, corresponden a los tumores de grado I y suponen un 75-92% de los meningiomas ^(4,55). Los meningiomas de grado II, también llamados atípicos, representan el 5-25% de los casos y los tumores de grado III, o anaplásicos, suponen un 3-5% de estos tumores ^(4,55).

Algunas variantes histológicas se han relacionado con una mayor agresividad y una capacidad de recidivar incrementada (tabla 2) ⁽⁴⁾. Los meningiomas de subtipo cordoide y de células claras muestran una frecuencia de recidivas del 42% y 61% respectivamente, por lo que se incluyen directamente en el grado II ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. En los meningiomas papilares y rabdoide, la recidiva se ha descrito en un 75 y un 80% de los casos respectivamente, motivo por el cual se consideran meningiomas de grado III ^(59,60).

Tabla 1. Criterios de la OMS para la designación del grado histopatológico de los meningiomas

<p>Meningioma Grado I Variante histológica diferente a células claras, cordoide, papilar o rabdoide Carencia de criterios de meningioma atípico o anaplásico</p>
<p>Meningioma Grado II Índice mitótico = 4 mitosis/10 HPF Al menos 3 de los siguientes parámetros: Celularidad incrementada Alto cociente núcleo/citoplasma Prominencia nucleolar Crecimiento en forma de hoja (shetting) Focos espontáneos de necrosis</p>
<p>Meningioma Grado III Índice mitótico = 20 mitosis/10 HPF Anaplasia celular Infiltración cerebral</p>

HPF, Campo de alto poder

Numerosos estudios han evaluado la importancia de determinar la proliferación celular en los meningiomas. La tasa de proliferación de las células tumorales, valorada con técnicas como la citometría de flujo, el radiomarcaje con desoxibromouridina o, más extensamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas, se correlaciona con el grado histopatológico y con la agresividad biológica, si bien varía bastante según la serie estudiada ^(30,61-66).

Actualmente, el marcador de proliferación que se utiliza más ampliamente en la evaluación de los meningiomas es la proteína nuclear Ki-67, que se expresa durante las fases activas del ciclo celular, es decir, G1, S, G2 y M ⁽⁶⁷⁾. El anticuerpo MIB-1 reconoce al antígeno Ki-67 y se puede utilizar en secciones de parafina. El índice MIB-1 muestra diferencias significativas entre los distintos grados histopatológicos, con grandes variaciones entre las distintas series publicadas: de 0,7 a 2,2% en meningiomas benignos, de 2,1 a 9,3% en atípicos y de 11,0 a 16,3% en meningiomas anaplásicos ^(61-63,65,68-70). Se ha sugerido que Ki-67 resulta especialmente útil en casos con atipia limítrofe, con un valor de corte de 4,2% ⁽⁷¹⁾. Además, está descrita su relación con la recidiva del meningioma, con valores de 0,9-3,8% en tumores no recidivantes y de 4,0-8,8% en meningiomas recidivantes ^(62,70,71).

Tabla 2. Relación entre el grado de agresividad y la histología en los meningiomas

	Variante
Grado I: Bajo riesgo de recidiva y crecimiento no agresivo	Meningotelial
	Fibroblástico
	Transicional
	Microquístico
	Angiomatoso
	Psamomatoso
	Secretor
	Metaplásico
	Linfoplasmocítico
	Grado II: Alta probabilidad de recidiva y/o comportamiento agresivo
Cordoide	
Células claras	
Grado III: Alta probabilidad de recidiva y/o comportamiento agresivo	Anaplásico
	Rabdoide
	Papilar
	Índice de proliferación >20 mitosis/ 10 HPF y/o invasión del tejido cerebral adyacente.

HPF, Campo de alto poder

2.5 La recidiva tumoral

La reaparición de la enfermedad tras el tratamiento quirúrgico es el principal problema de los meningiomas. En torno a un 12% de los casos recidiva a los 5 años, y un 25% lo hace en un plazo de 10 años, a pesar de lograr una cirugía Simpson 1-2 ^(11,30). La incidencia de recidivas en los tumores de grado I se sitúa entre un 7-20%, entre un 30-40% en los meningiomas de grado II y entre un 50-80% en los meningiomas de grado III ^(72,73). Histológicamente, la recidiva suele mostrar características similares al tumor primario; no obstante, en algunos casos ocurre una progresión hacia formas más agresivas del tumor ^(11,29,74), por lo que en ellos, aumenta el riesgo de una segunda recidiva ⁽⁷⁵⁾. Además, la recidiva tumoral puede ocurrir con localización igual o diferente respecto a la masa inicial ⁽³⁰⁾. Los meningiomas metastásicos son una entidad clínica rara con una frecuencia menor al 1% ⁽⁴⁾.

Múltiples moléculas han sido investigadas para tratar de predecir el pronóstico en el meningioma: marcadores de proliferación, proteínas reguladoras del ciclo celular, receptores de hormonas y factores de crecimiento. Muchos de ellos han mostrado correlación con el grado del tumor y/o con la capacidad de recidivar, pero es raro encontrar estudios amplios con resultados consistentes, lo que pone de manifiesto la necesidad de explorar nuevas técnicas de estudio con el objetivo de afinar el pronóstico en los meningiomas ^(41,42,50,51,70,76).

3 Alteraciones citogenéticas en el meningioma

Los cambios citogenéticos presentes en los meningiomas son diversos y pueden afectar tanto al número de cromosomas como a su estructura. De manera general, el 60% son hipodiploides, el 33% son diploides, y sólo el 7% presentan rangos superiores ^(77,78).

El meningioma fue el primer tumor sólido en el que se detectó una alteración citogenética característica, en el año 1967 ⁽⁷⁹⁾, aunque no fue hasta 1972 cuando se confirmó, mediante hibridación "*in situ*" de fluorescencia, que se trataba de la pérdida parcial o total del cromosoma 22 ^(80,81).

Algunos casos, presentan cambios cariotípicos complejos adicionales a la monosomía 22 o a cambios estructurales en este cromosoma. Entre los más frecuentes, encontramos las reestructuraciones del cromosoma 1, que suponen generalmente la pérdida de parte de su brazo corto (1p-) ⁽⁸²⁾. Esta alteración no es exclusiva de los meningiomas, pues está descrita en el cáncer de mama ⁽⁸³⁾, en un pequeño porcentaje de neuroblastomas ⁽⁸⁴⁾, y en torno al 25% de los oligodendrogliomas ⁽⁸⁵⁾ y de los leiomiomas ⁽⁸⁶⁾.

También son habituales las pérdidas del cromosoma 14 ⁽⁸⁷⁾, bien como monosomía 14 o como 14q-. Se trata de un cambio asociado a malignidad, no solo en el meningioma, sino en otras neoplasias como el carcinoma renal de células claras ⁽⁸⁸⁾, o los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) ⁽⁸⁹⁾.

En menor proporción, se detectan pérdidas de los cromosomas 10 y 18 ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. También están descritas las pérdidas de material genético en 6q, 9q y 17p ^(90,91,93-100). Las pérdidas cromosómicas se relacionan con la progresión tumoral. De hecho, la presencia de anomalías citogenéticas añadidas a las que afectan al cromosoma 22, en meningiomas de grado I, se relaciona con un mayor potencial maligno intrínseco a pesar de que se trate de tumores con histología benigna ^(74,101). Estas características citogenéticas apoyan la teoría de la existencia de una ruta genética en múltiples pasos, desde la génesis del tumor a la progresión en los meningiomas ^(91,93-96,98,102-105). La heterogeneidad cromosómica y la acumulación de cambios cromosómicos con la progresión, enfatizan la necesidad de estudiar las alteraciones genéticas de los meningiomas.

Algunos meningiomas también muestran ganancias cromosómicas. Aunque infrecuentes, son relativamente habituales en los tumores de alto grado. Las ganancias en 20q, 12q, 15q, 1q, 9q y 17q son las más habituales ^(90,106,107), lo que sugiere la existencia de genes en estos *loci*, implicados en la progresión de estos tumores ^(87,90,97-102,108-114).

Aunque, en principio son tumores citogenéticamente más sencillos que otros, también se han referido meningiomas con cambios citogenéticos complejos. Además de anomalías numéricas, los meningiomas presentan diferentes reestructuraciones cromosómicas, incluidos cromosomas en anillo, cromosomas dicéntricos, amplificación génica, asociaciones teloméricas e inestabilidad de microsatélites, cambios todos ellos que, en general, se relacionan con la agresividad tumoral ^(55,115). Estos cambios

cromosómicos se han podido identificar mejor con la introducción de técnicas con mayor poder de resolución ⁽¹¹⁶⁾.

La presencia de cariotipos complejos aumenta progresivamente con el grado tumoral; se estima en un 25-34% de los meningiomas benignos, en un 45% de los atípicos y un 70-79% de los anaplásicos (figura 2) ^(117,118).

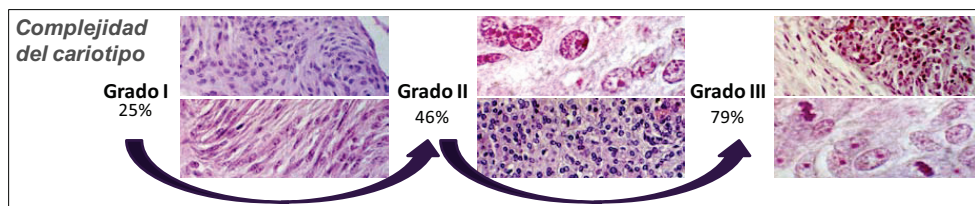


Figura 2. Porcentaje de casos con cariotipos complejos en los distintos grados histológicos; obsérvese la acumulación de alteraciones con el aumento de grado.

Son varios los modelos de evolución citogenética clonal que se han propuesto para explicar el origen y evolución de los meningiomas. El modelo clásico de evolución clonal recoge 4 grupos: el primer grupo comprende los meningiomas sin alteraciones cromosómicas (grupo 0), el segundo, aquellos con alteraciones del cromosoma 22 (grupo 1), mientras que el tercer grupo incluye los tumores con pérdidas en los cromosomas 10, 14, 18 y 19 (grupo 3) y el cuarto, recoge los meningiomas con pérdidas en 1p (grupo 4) (figura 3) ^(118,119). Según este modelo, los grupos se relacionan con los distintos grados histopatológicos del tumor, de manera que los meningiomas benignos se encuadran mayoritariamente en los grupos 0 y 1 mientras que los atípicos y anaplásicos, en los grupos 2 y 3. Además, los grupos 2 y 3 presentan una mayor frecuencia de recidivas, lo que indica que la complejidad cariotípica en ellos, resultaría de utilidad como factor pronóstico con capacidad predictiva ⁽¹¹⁸⁾.

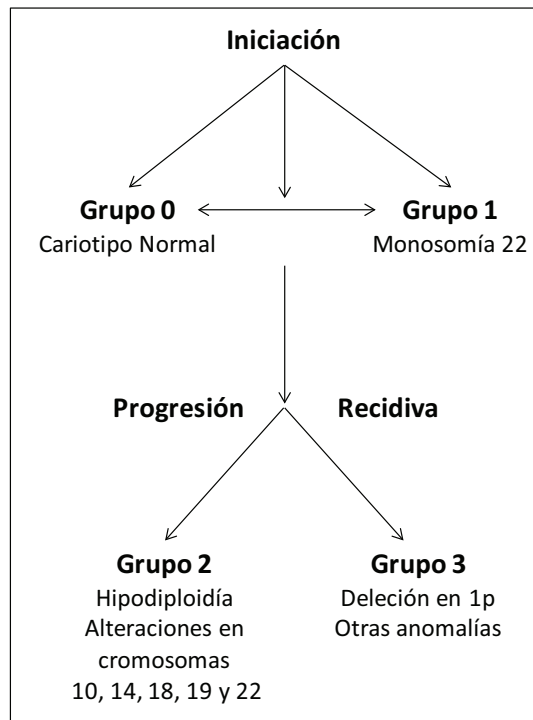


Figura 3. Modelo de evolución clonal basado en Ketter *et al.* ⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Grupos en función del perfil citogenético y el riesgo de progresión: los grupos 0 y 1 muestran comportamiento benigno, los grupos 2 y 3 ofrecen peor pronóstico.

3.1 Cambios asociados al cromosoma 22

La monosomía total o parcial del cromosoma 22 es la característica citogenética más común en los meningiomas. Las series publicadas muestran variaciones importantes en cuanto a la implicación de este cromosoma (entre un 40 y un 78%), si bien en los meningiomas asociados a Neurofibromatosis tipo 2 está alterado en el 100% de los casos ^(21,79,111,114,121-128).

En una revisión de más 850 publicaciones se determinó que el 30% de los meningiomas descritos mostraban la monosomía 22 como única alteración, y el mismo porcentaje la presentaba asociada a otros cambios cromosómicos. Además, en torno al 20% de los meningiomas mostraban cambios estructurales en el cromosoma 22. En conjunto, más del 75% de los meningiomas recopilados en ese trabajo presentaban monosomía 22 o cambios estructurales que implicaban a este cromosoma ⁽³⁸⁾.

Es habitual que ésta sea la única alteración citogenética presente ^(129,130), lo que sugiere que la inactivación de un *locus* supresor tumoral localizado en este cromosoma representa un evento temprano en la tumorigénesis de los meningiomas ^(110,111,131). Es posible que casos sin aparente afectación del cromosoma 22 contengan cambios en este cromosoma que no sean visibles citogenéticamente y requieran, por tanto, de aproximaciones moleculares, lo que justificaría las variaciones en las tasas de implicación que se encuentran en la literatura. En este sentido, técnicas como la FISH, el SKY o los *arrays* de CGH han puesto de manifiesto alteraciones genéticas en meningiomas con cariotipos aparentemente normales ⁽¹³²⁾. La pérdida de este cromosoma se produce indistintamente en meningiomas benignos, atípicos y anaplásicos ⁽¹³³⁾, lo que sugiere que las alteraciones del cromosoma 22 son un evento temprano en el meningioma, con un papel eminentemente iniciador en la génesis de estos tumores ^(129,134).

La monosomía 22 puede ir acompañada, en algunos meningiomas, por cambios que afectan al otro cromosoma 22, como deleciones, translocaciones o asociaciones teloméricas, lo que señala la vulnerabilidad del cromosoma 22 a sufrir alteraciones en estos tumores ^(131,135-142). Cabe mencionar que el isocromosoma del 22 también se detecta en meningiomas, aunque parece estar más involucrado en la progresión tumoral que en la génesis de estos tumores ⁽¹¹¹⁾.

El estudio de pacientes con meningiomas múltiples proporcionó pistas sobre el origen genético de los meningiomas, y demostró que las pérdidas en el cromosoma 22 afectan, concretamente, a la banda q12 (figura 4) ^(40,93,125,143-149). La consecuencia es la alteración del gen *NF2* y, en último término, la pérdida de expresión de la proteína que codifica, merlín ⁽⁴⁾. Posteriormente revisaremos estas características moleculares.

3.2 Cambios asociados al cromosoma 1

Las alteraciones genéticas más frecuentes en los meningiomas, tras las del cromosoma 22, afectan al cromosoma 1 y, más concretamente, a su brazo corto. Esta anomalía se detecta como alteración única ⁽¹²⁹⁾ o asociada a otros cambios cromosómicos ^(100,102,117). Los distintos grados histológicos muestran diferencias en cuanto a la frecuencia de alteraciones en este cromosoma, con cifras de en torno al 15%

en los meningiomas de grado I, al 60% en los de grado II y al 80% en los meningiomas de grado III (21,90,105,150,151).

La pérdida de 1p se detecta de manera global en un 25% de los meningiomas (96,102,152) y se asocia con deleciones en el cromosoma 22 y/o con cambios que llevan a la inactivación de *NF2* en un 33% de los casos (99,148,152-157). Numerosos análisis del estado del cromosoma 1 mediante hibridación genómica comparada (CGH) y estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH), apoyan la existencia de diferentes genes supresores de tumor que serían responsables de las pérdidas de diferentes segmentos en 1p (158). Las deleciones o alteraciones que afectan a genes situados en 1p22, en 1p21.1-p13 y 1p34-pter se han asociado con la progresión tumoral (90,96-100,102,103,105,108,150,159) y con un pronóstico clínico desfavorable (figura 4). De hecho, la LOH en 1p se considera un indicador con importante valor pronóstico debido a su capacidad para predecir la tendencia a recidivar de los meningiomas (21,119,152,160).

Aunque, en general, las pérdidas que afectan al cromosoma 1 se relacionan con la progresión, se ha sugerido que las deleciones concomitantes en 1p y 3p, determinadas mediante CGH, podrían contribuir a la tumorigénesis de los meningiomas como mecanismo alternativo a la pérdida del cromosoma 22 (161). Por otra parte, se ha detectado asociación entre las pérdidas del cromosoma 1p y la monosomía parcial en 7p y se ha relacionado con la progresión tumoral (162).

Las asociaciones teloméricas que implican al cromosoma 1 han sido descritas como un evento intermedio en el proceso de formación de deleciones, cromosomas dicéntricos y translocaciones desequilibradas del 1p en los meningiomas, conduciendo a pérdidas de información de este cromosoma (136).

3.3 Cambios asociados al cromosoma 14

El tercer cambio citogenético más frecuente que afecta a los meningiomas consiste en la pérdida total o parcial del cromosoma 14 -monosomía 14/14q- (21,87,94,96,98-100). Las deleciones en 14q se detectan en torno al 20% de los meningiomas de grado I, y al 40-60% de los meningiomas de grados II y III (90,163). Con menor frecuencia se observan reordenamientos estructurales como la t(1;14) y la t(14;22). Los puntos de rotura más frecuentes son 14q11, 14q24.3-q32.33 y 14q32-qter (figura 4), lo que sugiere la

existencia de genes implicados en la biología del meningioma en estas localizaciones cromosómicas (103,104,109,117,132,136,164).

De manera análoga al cromosoma 1, las pérdidas en el cromosoma 14 se relacionan con la progresión tumoral y con un pronóstico desfavorable en los meningiomas (98,165), si bien todavía no se ha identificado ningún gen que, de manera consistente, sea responsable de esta agresividad biológica (166,167).

3.4 Otros cambios cromosómicos en meningiomas

Los meningiomas muestran alteraciones en distintos cromosomas que, aunque son menos frecuentes que las que afectan a los cromosomas 1, 14 y 22, se han relacionado con la progresión tumoral. Entre ellas cabe destacar las que afectan a los cromosomas 9p (90,168), 10q (90,91,169), 17q y 18 (90,92).

La pérdida de material genético en el brazo largo del cromosoma 18, una de las alteraciones que con más frecuencia se asocia a la progresión tumoral en el meningioma, se detecta en un porcentaje pequeño de tumores benignos, en torno al 14%, pero alcanza tasas del 40-50% en meningiomas atípicos y anaplásicos (90,92).

Las deleciones en el cromosoma 10 (10q-) afectan al 5-12% de los meningiomas de grado I, al 29-40% de los de grado II y al 40-58% de los de grado III (90,96,170). Las alteraciones en este cromosoma se relacionan con un curso clínico agresivo a causa de su aumento de incidencia con el aumento del grado histológico (169), aunque las variaciones de su incidencia en las diferentes series hacen que no exista una asociación necesaria con la progresión del tumor (90,91,96,169,170).

Los cambios en el cromosoma 9 se detectan principalmente en meningiomas de grado III, con una incidencia del 40-75% (90,97), y se determinan mejor mediante técnicas de citogenética molecular que mediante la clásica (168); el cromosoma 9 se encuentra alterado en un 20-52% de los tumores de grado II y en alrededor de un 5%-17% de los meningiomas de grado I (90,100,168). Cabe señalar que los genes supresores de tumor *CDKN2A* (p16^{INK4a}/MTS1/p14^{ARF}) y *CDKN2B* (p15^{INK4b}/MTS2) con frecuencia están inactivados en distintos tipos de neoplasias; codifican proteínas que participan en el control del ciclo celular, y se encuentran en el *locus* p21 de este cromosoma (100,168,171); profundizaremos en ellos en el apartado de alteraciones moleculares.

El cromosoma 17, aunque en ocasiones muestra pérdidas de material, resulta más relevante por la amplificación en 17q, que se detecta en más de la mitad de los meningiomas anaplásicos, cerca del 20% de los meningiomas atípicos y algo más del 10% de los meningiomas benignos ⁽⁹⁰⁾.

Se han descrito, también, pérdidas en los cromosomas 3p, 5, 6q, 7, 8, 11, 18, X e Y, y ganancias que afectan a los cromosomas 1q, 9q, 12q, 15q y 20q ^(90,114,161,162,172). Quizá de este último grupo, las más llamativas sean las pérdidas que afectan a los cromosomas sexuales debido a su frecuencia. Entre el 15% y el 45% de los meningiomas en varones muestran pérdidas del cromosoma Y, que en un 5% de los casos es la única alteración citogenética detectada. Esta pérdida no muestra asociación con la edad al diagnóstico. Por otra parte, cerca del 5% de los meningiomas en mujeres muestran pérdidas de un cromosoma X, que habitualmente se asocia a cariotipos más complejos ^(140,167,173).

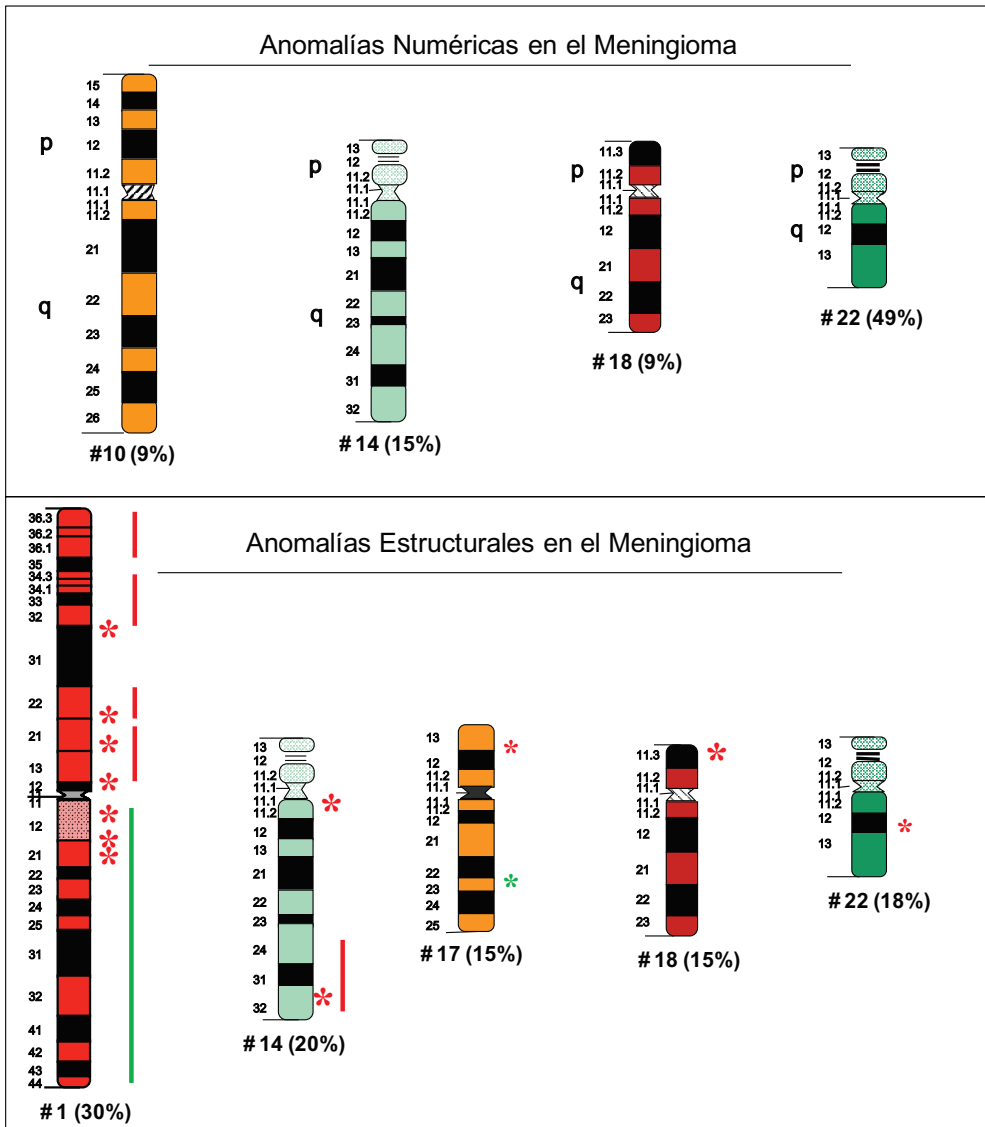


Figura 4. Esquema de los cromosomas más frecuentemente alterados en el meningioma. Se indican en rojo los puntos de rotura más habitualmente descritos y en verde las regiones que muestran ganancias (cromosoma 1q, cromosoma 17).

4 Alteraciones moleculares en el meningioma

4.1 Genes asociados al cromosoma 22

4.1.1 El gen *NF2* y su relación con la tumorigénesis del meningioma

Los cambios que afectan al cromosoma 22 en meningiomas están estrechamente relacionados con aquellos que afectan al gen *NF2*. Este gen, localizado en 22q12, es el responsable del síndrome hereditario, autosómico dominante, Neurofibromatosis tipo 2 (174). La mitad de los pacientes afectados de este síndrome desarrollan meningiomas y lo hacen a edades más tempranas que los pacientes con tumores esporádicos, con una mayor incidencia de meningiomas múltiples (175,176). Este hecho fue el que permitió relacionar la pérdida de función del *locus* génico de *NF2* con la génesis del meningioma.

El gen *NF2* está formado por 17 exones, y presenta procesado alternativo entre los exones 16 y 17, lo que resulta en 2 isoformas muy parecidas estructuralmente y con funciones similares (177). El producto codificado es la proteína merlín: una proteína supresora de tumor, reguladora negativa del crecimiento tumoral (177,178). Merlín es un miembro de la familia de proteínas estructurales homólogas a la banda 4.1 (que incluye ezrina, radixina y moesina), que median la unión de proteínas de la membrana al citoesqueleto (figura 5A) (177,179,180). La secuencia proteica de los miembros de esta superfamilia, conocidas como proteínas ERM, está muy conservada; consiste en un dominio N-terminal que enlaza con las proteínas de la membrana, un dominio rico en α -hélice y un dominio C-terminal que interacciona con las proteínas del citoesqueleto (figura 5B). En el caso de merlín, los aminoácidos entre la posición 1 y 311 constituyen el dominio N-terminal (exones 1-9) desde los aminoácidos 312 al 505, el dominio rico en α -hélice, (exones 10-15) y el dominio C-terminal abarca desde 506 hasta el final (exones 16-17, figura 5C) (181,182).

La mayoría de los meningiomas presentan ausencia o disminución en la inmunorreactividad a la proteína merlín (183-185), si bien se ha comprobado la necesidad de que haya dos alteraciones en este gen para que su expresión se modifique (121,174,179).

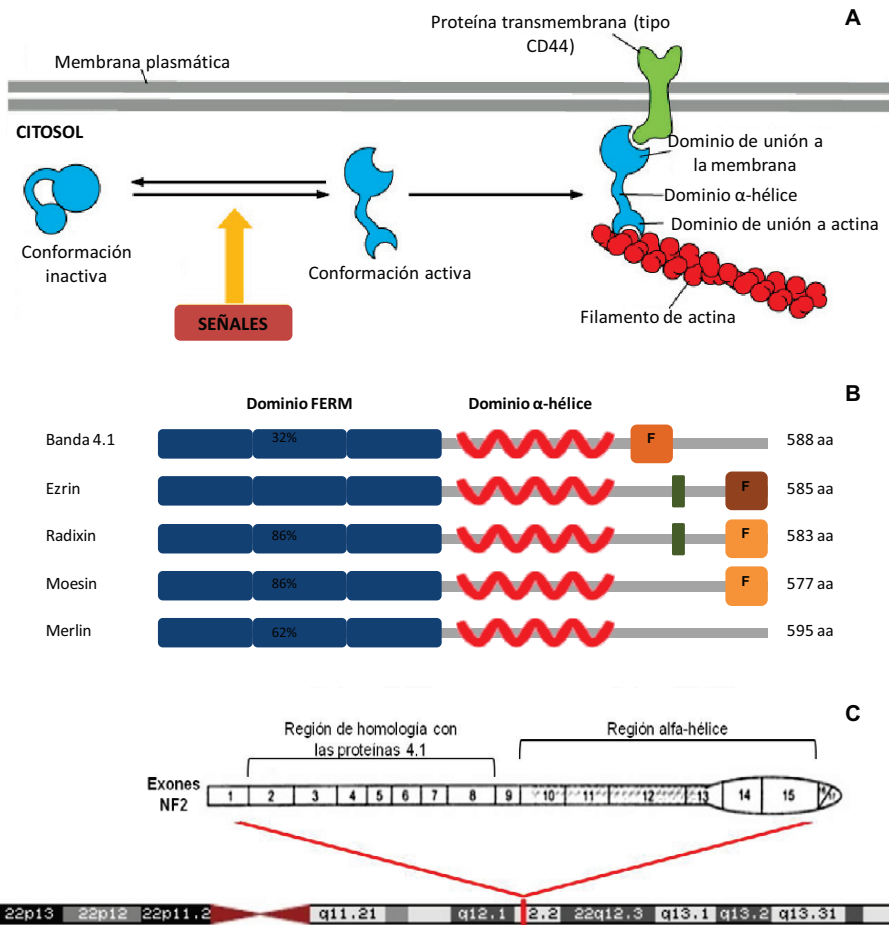


Figura 5. Mecanismo de acción y estructura de la proteína merlín. A: Merlín, en azul, interacciona con proteínas de la membrana plasmática y con filamentos del citoesqueleto (Extraído de Molecular Biology of the Cell). B: proteínas de la familia 4.1, con una estructura muy conservada: la región N-terminal contiene el dominio FERM que las caracteriza. El dominio rico en hélice alfa se prolonga hasta el final de la proteína. Todas las proteínas de la familia salvo merlín contienen un sitio de unión a F-actina (F). Ezrina y moesina contienen regiones ricas en prolina (en verde), de función desconocida. C: Esquema del cromosoma 22 con representación de sus bandas. Se indica en rojo la posición del gen NF2 y se detalla la composición en exones del gen y la función de las diferentes partes, así como los codones que comprenden las dos regiones principales de la proteína merlín.

Aunque el mecanismo preciso mediante el cual merlín ejerce su actividad supresora tumoral e inhibe la proliferación de las células meníngeas no está claramente establecido, participa en el control de las uniones célula-célula mediadas por cadherina (186,187); su actividad como regulador negativo del crecimiento tumoral ha sido demostrado *in vitro* (178,187). Interacciona con proteínas que afectan a la señalización de

Ras, a la activación de la fosfatidilinositol-3-kinasa y/o a la expresión de la ciclina D1 (177,188). La disrupción de esta cascada de señalización que lleva a la reorganización del citoesqueleto se considera crítica para la formación del tumor, y la deficiencia de merlín promueve la tumorigénesis mediante la desestabilización de las uniones adherentes (187). Merlín interacciona además con otras muchas proteínas de la familia 4.1 y, de manera análoga, numerosas proteínas de la familia 4.1 funcionan como reguladores del crecimiento en los meningiomas (180,188).

Las mutaciones y deleciones que truncan *NF2* suponen la alteración genética más frecuente en meningiomas. Entre el 40 y el 70% de todos los meningiomas, incluyendo esporádicos y asociados a Neurofibromatosis tipo 2 (4,125,126) y el 60% si consideramos únicamente los tumores esporádicos, presentan pérdida de heterocigosidad (LOH) en 22q12.2 (123,124,143,174,176,189-191). Se trata de pequeñas inserciones, deleciones, o mutaciones sin sentido, que afectan a las zonas que regulan el procesado del ARNm, crean codones de parada o resultan en cambios en la pauta de lectura, y ocurren preferentemente en los dos tercios más próximos a 5' del gen *NF2* (124). Estos cambios representan una alteración temprana en la mayoría de los meningiomas (123,141,142,153,192-195). La frecuencia de mutaciones en este gen varía entre los 3 subtipos histológicos más habituales de meningioma: los meningiomas fibroblásticos y transicionales presentan mutaciones génicas en *NF2* en un 70-80% de los casos, mientras que los meningiomas meningoteliales únicamente en un 25% (124,143,145,190,196). Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo patogénico alternativo a la pérdida de *NF2* en la histología meningotelial (124,142,143,183,185,190).

El análisis de la frecuencia de alteraciones en *NF2* en función de la localización tumoral, ha mostrado una menor frecuencia en los tumores que se forman en la base del cráneo; no obstante, la elevada frecuencia de meningiomas meningoteliales en esta localización apoya la teoría de una histogénesis diferente en este subtipo tumoral (196).

En algunos meningiomas, a pesar de la falta de la proteína merlín, no se detectan mutaciones en *NF2* o LOH en 22q. Se ha sugerido que la μ -calpaína, una proteasa de cisteínas neutras dependiente de calcio, es la responsable de este fenómeno (193,197). El 50% de los meningiomas presentan la forma activa de la μ -calpaína, aunque no se ha podido asociar con el status de merlín (197). Por otra parte, la concordancia entre la LOH en 22q y la pérdida de merlín sugiere que otros mecanismos, como la deleción

homocigota o la metilación, así como mutaciones en *NF2* no detectadas, serían responsables de la pérdida de expresión de esta proteína ⁽¹⁸⁹⁾.

Se esperaba que el estudio del gen *NF2* proporcionara pistas importantes sobre la patogénesis de los meningiomas atípicos y anaplásicos, pero el 70% de los casos muestran mutaciones en este gen, coincidiendo con la frecuencia en meningiomas benignos transicionales y fibroblásticos, lo que sugiere, por tanto, que la afectación de *NF2* no está implicada en la progresión hacia grados superiores ^(93,116,198).

4.1.2 Otros genes relacionados con la iniciación tumoral situados en el cromosoma 22

La frecuencia de LOH en el cromosoma 22 excede a la de mutaciones en *NF2* y a la presencia de deleciones intersticiales y translocaciones en 22q que no incluyen el *locus* de *NF2* ⁽¹⁴³⁾, por lo que se ha estudiado el posible rol de otros genes, localizados en este cromosoma, en la génesis de los meningiomas (tabla 3) ^(116,199-203).

De acuerdo con esta hipótesis, se ha sugerido la implicación del gen *BAM22*, localizado en 22q12, que es un miembro de la familia β -adaptina que participa en el reclutamiento de la clatrina en el aparato de Golgi y en el tráfico vesicular de proteínas. Este gen presenta deleciones en homocigosis en un 13% de los meningiomas ⁽²⁰⁴⁾ si bien no ha sido posible identificar mutaciones en él, lo que sugiere la participación de mecanismos epigenéticos en su inactivación ⁽²⁰⁵⁾.

El gen *MN1* localizado en 22q12.1 se describió interrumpido por una t(4;22) en un caso de meningioma ^(114,200). No obstante, la limitada bibliografía al respecto lo propone más como un co-activador que como un supresor tumoral propiamente dicho ⁽³⁸⁾.

La inactivación del gen *RRP22*, que codifica una GTP-asa de la familia Ras-like con función inhibidora de la proliferación celular, también se ha descrito en el meningioma, así como la de *Gar22*, que se sitúa adyacente a la región del gen de la β -adaptina y es un represor del crecimiento celular. La localización de ambos en 22q12.2 los apoya como genes implicados en la tumorigénesis de los meningiomas ⁽²⁰⁶⁾.

En gen *SMARCB1*, situado en 22q11.23, codifica la proteína Ini1 que forma parte del complejo remodelador de la cromatina y ejerce su función en el control de la transición G0/G1 del ciclo celular. En él, se han identificado mutaciones inactivantes en el exón 9

en un pequeño porcentaje de casos, y se postula la existencia de variantes polimórficas en los meningiomas ^(194,207).

Está descrita la ausencia de expresión de *CLH-22*, localizado en 22q11.21, en más del 50% de los meningiomas analizados, sin que exista asociación directa con la delección del cromosoma 22. Aunque esto sugiere su implicación en la tumorigénesis de los meningiomas, tampoco se han identificado mutaciones inactivantes en este gen codificante de las cadenas pesadas de la clatrina ^(201,206).

Por último el gen *LARGE*, situado en 22q12.3 y con función en la glicosilación de proteínas del aparato de Golgi, también ha sido relacionado con el desarrollo tumoral en los meningiomas, si bien no se han realizado análisis mutacionales y de expresión suficientemente extensos hasta el momento ⁽²⁰³⁾.

Tabla 3. Genes situados en el cromosoma 22 que han sido relacionados con la biología de los meningiomas

Gen	Locus	Proteína	Mod	Función	Efecto en meningioma
SMARCB1	22q11.23	Ini1 (componente de BAX)	LOH	Remodelación cromatina	Tumorigénesis ⁽²⁰⁷⁾
AP1B1	22q12	β-adaptina	LOH	Reclutamiento clatrina Golgi	Tumorigénesis ^(204,205)
RRP22	22q12.2	Ligando Ras 10A	LOH	Vía mTOR	Tumorigénesis ⁽²⁰⁶⁾
CLH22	22q11.21	Cadenas pesadas de clatrina	LOH	Transducción de señales	Tumorigénesis ^(201,206)
Gar22	22q12.2	Growth Arrest-Specific Protein 2-Like 1	LOH	Adhesión celular	Tumorigénesis ⁽²⁰⁶⁾
MN1	22q12.1	Meningioma 1	t(4,22)	-	Tumorigénesis ⁽²⁰⁰⁾
LARGE	22q13.3	Acetylglucosaminyl transferase-Like Protein	Infra	Glicosilación proteínas	Tumorigénesis ⁽²⁰³⁾

Infra, pérdida de expresión; LOH, pérdida de heterocigosidad; t, translocación.

4.2 Genes localizados en el cromosoma 1

Se ha demostrado que el brazo corto del cromosoma 1 se muestra con frecuencia deleciónado en el meningioma, y que esta deleción es más habitual en grados de agresividad superiores ⁽¹⁰²⁾. Por ello, en esta región se han estudiado numerosos genes candidatos, como son *MUTYH*, *PRDX1*, *FOXD2*, *FOXE3* o *PTCH2* en 1p33-p34 ⁽¹⁵²⁾. Genómicamente próximo se sitúa *EPB41* (1p33-p32); se trata de otro gen de la familia de proteínas estructurales 4.1, que codifica la proteína 4.1R y su localización cromosómica lo señala como implicado en la biología de los meningiomas ⁽¹⁵⁸⁾. También se ha detectado la disminución de expresión del gen *JUN*, que participa en la activación de la transcripción y se sitúa en 1p32-p31 ⁽²⁰⁸⁾, y del gen *CASP9*, que activa la apoptosis además de responder a la señalización vía receptor de la insulina y localizado en 1p36 ⁽²⁰⁹⁾.

En 1p36-p34, está el *locus* del gen de la fosfatasa alcalina (*ALPL*), cuya deleción causaría la inactivación de este enzima y le conferiría relevancia en la biología del meningioma ^(160,210); la pérdida de expresión de *ALPL* se ha constatado especialmente en recidivas tumorales ^(211,212).

RAD54L, situado en 1p32, participa en la reparación del ADN por recombinación, y aunque su mutación en el meningioma es poco frecuente ^(151,161), se ha observado un polimorfismo silente que podría estar asociado con el desarrollo de este tumor ⁽²¹³⁾.

Otro gen en esta misma región es *CDKN2C* (p18^{INK4}); la proteína codificada por este gen es de la familia de los inhibidores de kinasas dependientes de ciclina con función en el control del ciclo celular. Si bien se han descrito mutaciones en una pequeña cantidad de casos ^(100,160), en algunos trabajos no detectan su afectación en los meningiomas ^(100,146,214).

El candidato a supresor tumoral más firme, situado en esta región, pertenece a la familia de factores de transcripción de *TP53*; se trata del gen *TP73* situado en 1p36.33. Sus funciones varían dependiendo de si la isoforma presente conserva o no un dominio de transactivación, pero en general actúa sobre el control del ciclo celular, con funciones pro o antiapoptóticas dependiendo del estado del mencionado dominio ⁽²¹⁵⁾. La presencia de mutaciones ha sido baja en los trabajos que exploran este tipo de cambios ^(216,217), pero su inactivación por mecanismos epigenéticos resulta más evidente como se explicará en los siguientes apartados.

En conjunto, si bien parecía que el análisis de genes individuales en 1p no apoyaba una función supresora del meningioma en ninguno de los genes investigados, en los últimos años, los estudios epigenéticos sugieren su implicación en este tipo tumoral (figura 6) ⁽¹¹⁶⁾.

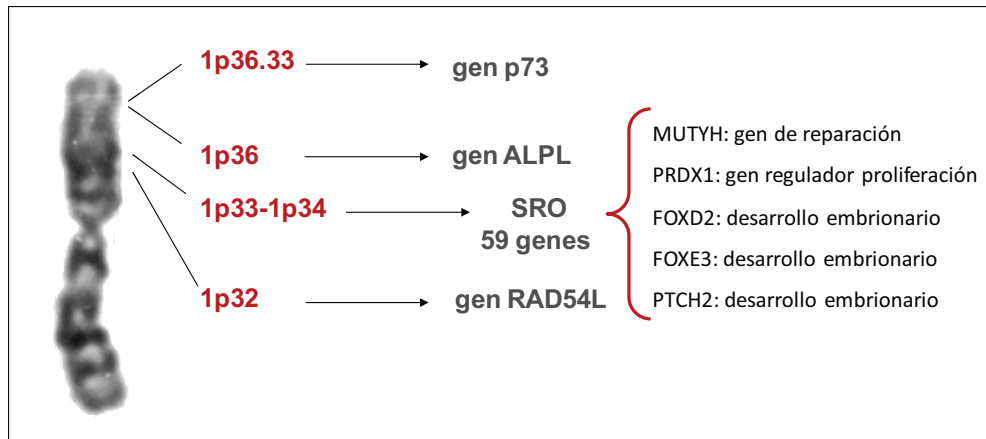


Figura 6. Cromosoma 1 teñido con bandas G. Se señala la localización de los genes que con mayor frecuencia presentan alteraciones genéticas.

4.3 Otros loci génicos implicados en el meningioma

La pérdida de *DAL-1* (en 18p11.3) se ha descrito en un 60-76% de los meningiomas; este gen codifica una proteína con propiedades supresoras de tumor que, al igual que la proteína merlín, es miembro de la familia de proteínas estructurales 4.1 ⁽¹⁰⁶⁾. Sus funciones se relacionan con la inhibición de la proliferación celular y la promoción de la apoptosis, a través de la activación de la vía de señalización c-Jun-NH2-kinasa (JNK) en el meningioma ⁽²¹⁸⁾. Además, la proteína codificada por *DAL-1* interactúa con el gen *TSLC1* (11q23.2), cuya pérdida de expresión en las leptomeninges se relaciona con el grado histológico del meningioma ⁽²¹⁹⁾. La frecuencia con que se detecta la pérdida de *DAL-1* lo postula como un gen iniciador, ya que el 92% de los meningiomas muestran deleciones bien en *DAL-1* o bien en *NF2*. Además, estos genes se encuentran alterados simultáneamente en un 58% de los casos y su frecuencia alcanza el 70% en meningiomas anaplásicos ^(40,106,220).

Estudios recientes de expresión génica han demostrado una disminución de la transcripción del gen *NDRG2* (localizado en 14q11.2) en meningiomas anaplásicos, aunque este hecho parece deberse más bien a mecanismos de inactivación epigenéticos (165,221).

La pérdida del *locus* 9p21 es importante en múltiples neoplasias ya que contiene genes fundamentales para el control de la transición G1/S del ciclo celular. El primero de ellos, *CDKN2A* (p14^{ARF}), interacciona con el oncogén *MDM2* promoviendo su degradación y permitiendo que p53 desarrolle su función con normalidad. Las alteraciones en *CDKN2A* conllevan la desregulación de este sistema de control. *CDKN2B*, por su parte, participa en el control de la transición G1/S del ciclo celular. Las pérdidas alélicas de este *locus*, preferentemente su delección en homocigosis, resultan importantes en la progresión de los meningiomas atípicos y anaplásicos, con una frecuencia de más del 50% de los meningiomas de grado III, frente a su frecuencia en meningiomas de grado I, que se sitúa alrededor del 3% (90,97,100). Concretamente, las delecciones de *CDKN2A* se detectan en un 5-17% de los meningiomas benignos, en un 18-52% de los atípicos y en un 38-74% de los anaplásicos. La pérdida de *CDKN2A* y *CDKN2B* afecta al 3% de los meningiomas atípicos pero alcanza el 46% de los anaplásicos (100,168,171); de manera global las alteraciones de este *locus* son más frecuentes en las recidivas tumorales. Además, las alteraciones en *CDKN2A* en pacientes con meningiomas, se relacionan con una menor esperanza de vida (168).

El brazo largo del cromosoma 10 que, como hemos comentado, muestra delecciones especialmente en meningiomas de grados superiores, contiene varios genes susceptibles de verse afectados y, en consecuencia, son candidatos a supresores tumorales implicados en la agresividad biológica de los meningiomas (170,222). De ellos, han sido estudiados *PTEN*, en 10q23.3, implicado en la patogénesis de otras neoplasias, *DMBT1* y *MXI1*. Se han descrito mutaciones somáticas en *PTEN* en meningiomas de grados II y III que, si bien son relativamente poco frecuentes, señalan su implicación en la progresión y no en la génesis de estos tumores (170,222).

El gen *APC*, situado en 5q21-q22, participa en la vía de señalización Wnt, presenta pérdida de heterocigosidad en el 47% de los meningiomas estudiados y parece estar únicamente alterado en meningiomas de grado I (172).

El gen supresor de tumor *TP53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, es uno de los oncogenes más habitualmente alterados en distintos tipos de tumores sólidos; sin embargo, no se han identificado mutaciones en meningiomas. La pérdida de función de este gen, en algunos casos, parece resultar más bien consecuencia de la ausencia de *CDKN2A* y el consiguiente incremento de *MDM2* ⁽²²³⁾.

Se ha descrito, mediante estudios de CGH, la amplificación de la región 17q en meningiomas anaplásicos ⁽⁹⁰⁾. El gen *PS6K* situado en 17q23 se encuentra sobreexpresado en una pequeña proporción de meningiomas anaplásicos (<15%) pero no en benignos ni en atípicos ^(224,225).

Otros estudios relacionan la génesis del meningioma con el gen del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), localizado en 7p11.2 ⁽²²⁶⁾, el de la endotelina 1, en 6p24.1 ⁽²²⁷⁾, el factor de crecimiento insulina-like I (*IGF1R*) en 15q26⁽²²⁸⁾ o el factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) ⁽²²⁹⁾.

Los últimos avances en análisis genómico han determinado la existencia de mutaciones iniciadoras alternativas a las alteraciones en *NF2* en el meningioma, que afectan a los genes *TRAF7*, *KLF4*, *AKT1* y *SMO*. El gen *TRAF7* codifica una proteína proapoptótica con actividad E3-ubiquitin ligasa que participa en múltiples vías de señalización, incluyendo la de *NFκβ* ⁽²³⁰⁾; se localiza en 16p13.3 y muestra una frecuencia de alteraciones de entre el 25% y el 37% de los meningiomas sin implicación de *NF2* ⁽²³¹⁾. *KLF4* codifica la secuencia de un factor de transcripción que se localiza en 9q31.2; las deleciones en su dominio de unión al ADN se relacionan con el bloqueo de la diferenciación celular ⁽²³²⁾; está alterado en el 10% de los meningiomas, y en asociación con la pérdida de *NF2* en un 16,1% de los casos. La mutación *AKT1*^{E17K} se ha descrito en un 12,7% de los meningiomas y ocurre simultánea a la alteración de *TRAF7*; además, estas mutaciones parecen excluyentes de las que afectan a *KLF4*. *AKT1* participa en la ruta del fosfoinositol-3-fosfato (PI3K) y su localización cromosómica es 14q32, región frecuentemente alterada en meningiomas atípicos y anaplásicos. Por último, las mutaciones en *SMO* (localizado en 7q32) se han demostrado en un porcentaje pequeño de casos (3,6-5,7%) y activan la vía de señalización *Hedgehog* (Hh) ^(231,233).

5 Alteraciones epigenéticas en el meningioma

Los cambios epigenéticos desempeñan un papel importante en la biología tumoral (234,235). En las células normales, las regiones promotoras de la mayoría de genes se encuentran densamente pobladas con dinucleótidos C-G, conocidos como “islas CpG”. Estas islas se mantienen con un patrón de metilación bajo y constante por mecanismos que aún no se han esclarecido. Se ha visto que la hipermetilación de islas CpG en los promotores génicos resulta en la pérdida de la función génica; cuando esto ocurre en el promotor de un gen supresor tumoral, las células adquieren una ventaja selectiva. Así, la hipermetilación de islas CpG actúa como una alternativa a la mutación o delección para eliminar la función de genes supresores de tumor, y son muchos los genes con este tipo de alteración en cáncer (figura 7) (234,235).

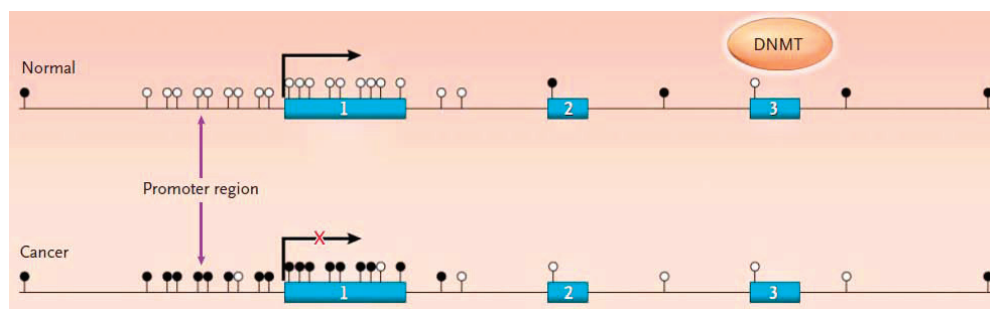


Figura 7. Distribución de los dinucleótidos CpG metilados (círculos negros) y sin metilar (círculos blancos), en genes supresores de tumor de células normales y células tumorales. Se representan en cajas los exones y en línea los intrones. En las células normales, la mayoría de los sitios CpG fuera de las islas CpG están metilados, mientras la mayoría de las islas CpG en los promotores no están metilados. En las células neoplásicas se da la situación contraria, contribuyendo al silenciamiento génico (tomado de Herman *et al.* (236)).

A pesar de la abundante bibliografía disponible sobre cambios genéticos en el meningioma y a diferencia de los cambios citogenéticos, no existe consenso en la literatura en cuanto a la reproducibilidad y significancia de los hallazgos realizados. Por este motivo, actualmente, se está tratando de profundizar en el conocimiento de los mecanismos epigenéticos que pueden encontrarse alterados en los meningiomas. Trabajos recientes muestran alteraciones que podrían ser relevantes, ya que afectan a la expresión de genes implicados en mecanismos de reparación del ADN, control del ciclo celular, vías de detoxificación o inhibición de la angiogénesis (237).

Los estudios genéticos de alto rendimiento muestran que aproximadamente el 40% de los meningiomas no presentan alteraciones genéticas ⁽²³⁸⁾ mientras que el 77% de los meningiomas presentan patrones de metilación aberrante al menos en un gen ⁽²³⁹⁾. Los más frecuentemente descritos en la bibliografía se comentan a continuación.

El gen inhibidor de la metaloproteinasa 3 (*TIMP3*), localizado en 22q12, es el gen más ampliamente descrito por su posible contribución a la progresión tumoral en el meningioma. La proteína para la que codificada, participa en la degradación de la matriz extracelular, en procesos de apoptosis y también en angiogénesis. Se ha detectado la hipermetilación de su región promotora en el 67% de los meningiomas anaplásicos, hecho que solo se da en el 22% de los meningiomas atípicos y en el 17% o menos, según la serie analizada, de los meningiomas de grado I ^(237,239,240). Además la alteración epigenética de este gen se relaciona con la pérdida de heterocigosidad en 22q12 ^(239,240).

El gen *TP73*, homólogo de *TP53*, situado en 1p36.33, del que ya hemos comentado que las mutaciones inactivantes parecen infrecuentes, se encuentra hipermetilado en meningiomas y se sugiere su implicación tanto en la tumorigénesis ⁽²⁴¹⁾ como en la transformación maligna en el meningioma, a través de su papel en los procesos de apoptosis ^(216,217,242,243).

El gen *RASSF1A* (en 3p21.3) codifica una proteína que contiene un dominio de unión para RAS ⁽²⁴⁴⁾, por lo que participa en la activación de la apoptosis vía Fas. Se ha descrito su inactivación mediante hipermetilación del promotor en meduloblastomas y gliomas, entre otros ⁽²⁴⁵⁾. En meningiomas, se ha descrito su hipermetilación en el 16,7-18,2% de los tumores benignos ^(241,245) y en el 55,6% de los meningiomas de grados superiores ⁽²⁴¹⁾, lo que apoya su relación con la progresión tumoral.

El gen *HIST1H1c* (6q21.3) está implicado en la fragmentación del ADN y en la muerte celular programada; se sobreexpresa en meningiomas primarios, y más aun en recidivas, donde alcanza frecuencias de hasta el 89% ^(238,246).

NDRG2 (14q11.2), implicado en el crecimiento celular y en los mecanismos de apoptosis, se ha visto infraexpresado en meningiomas de grado III ⁽¹⁶⁵⁾. Esta reducción se relaciona con la hipermetilación de su promotor ya que no se han detectado mutaciones inactivantes en este *locus* génico ^(165,221).

Los genes de control del ciclo celular situados en 9p21 no solo están afectados por deleciones en los meningiomas, también se ha observado hipermetilación aberrante de los promotores de *CDKN2A* y *CDKN2B*, hecho que se asocia con la progresión tumoral en estos tumores ^(243,245). Bostrom *et al.* detectan, además de la LOH, esta hipermetilación en una pequeña proporción de los casos, si bien la metilación en este *locus* parece que, en general, es parcial ⁽¹⁰⁰⁾.

Los factores de transcripción de la familia de genes homobox (*HOX*), concretamente *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA9* y *HOXA11*, situados en 7p15.2 se silencian por cometilación y se han relacionado con la progresión tumoral en el meningioma ^(247,248).

El gen *MGMT*, situado en 10q26, codifica un enzima de reparación del ADN y participa en el control del ciclo celular por interacción con p53. Se ha detectado la hipermetilación monoalélica de su promotor sólo en un 6-11% de los meningiomas ^(237,249). Esta tasa baja de metilación indica que, a diferencia de lo que ocurren en el glioblastoma multiforme, no es una diana terapéutica a considerar para el tratamiento con temozolamida en el meningioma ⁽²⁵⁰⁾.

La regulación epigenética del gen trombospodina 1 (*THBS1*, localizado en 15q15) inhibe la angiogénesis e induce la apoptosis de las células endoteliales. El 54% de los meningiomas de grado III y el 30% de todos los meningiomas muestran hipermetilación en este gen, lo que sugiere que su inactivación promueve la angiogénesis y contribuye a la progresión tumoral en estos tumores ⁽²³⁹⁾.

El receptor de estrógenos, por su parte, está involucrado en la inhibición del crecimiento mediante respuestas hormonales. Se ha descrito la hipermetilación de su gen codificante (*ESR1*, localizado en 6q25.1) en un 15% de los meningiomas ^(234,239). La variación en su expresión inmunohistoquímica sugiere la participación de mecanismos genéticos y epigenéticos en la desregulación de este gen, que deben ser explorados en el meningioma ⁽⁵¹⁾.

La hipermetilación del gen *GSTP1* (11q13.2), miembro de la familia glutatión-S-transferasa, se ha descrito en el 32% de los meningiomas atípicos y en el 54% de los anaplásicos; muestra, por tanto, asociación entre las alteraciones en su regulación epigenética y el grado histopatológico en estos tumores ⁽²³⁷⁾.

6 Vías de señalización en meningiomas

Las rutas de señalización celular son redes de cascadas de señales que controlan varios procesos intracelulares, tales como la diferenciación, proliferación, etc. Una alteración en cualquiera de los genes que forman la cascada puede afectar a la transducción de señales a lo largo de toda la ruta, y son varias las vías implicadas de manera importante en la progresión de los meningioma. Las alteraciones genéticas y epigenéticas descritas en estos tumores ponen de manifiesto cambios que conducen a la disregulación en la transcripción y que favorecen la neoformación de vasos sanguíneos y la alteración de la adhesión celular; además, se produce una importante falta de control sobre el ciclo celular, que a su vez se ve potenciada por los defectos de genes de respuesta a los daños del ADN y finalmente, por el defecto funcional de los mecanismos celulares de muerte celular programada, que se traducen en un disminución de la apoptosis (tabla 4).

Tabla 4. Genes cuya alteración ha sido explorada en el meningioma

Función	Genes
Regulación de la transcripción	<i>EGFR</i> ^(226,251) , <i>ET-1</i> ⁽²²⁷⁾ , <i>TRAF7</i> ⁽²³¹⁾ , familia <i>HOX</i> ^(247,248) , <i>WNK2</i> ⁽²³⁸⁾ , <i>NDRG2</i> ⁽²²¹⁾ , <i>IGF2</i> y <i>IGF1R</i> ^(248,252,253)
Angiogénesis	<i>ET-1</i> ⁽²²⁷⁾ , <i>THBS1</i> ^(239,249) , <i>COX-2</i> ^(53,254,255)
Adhesión celular	<i>CTNNB1</i> ⁽²⁵⁶⁾ , <i>CDH1</i> ⁽²⁵⁷⁾ , <i>TSCL1</i> ⁽²¹⁹⁾ , <i>IGSF4</i> ⁽²⁵⁸⁾ , <i>CADM1</i> ⁽²¹⁹⁾
Control del ciclo celular	<i>TP73</i> ^(238,241,243,259) , <i>ALPL</i> ⁽²⁵⁵⁾ , <i>CDKN2A</i> y <i>CDKN2B</i> ^(100,171,223,249) , <i>Hist1H1C</i> ⁽²³⁸⁾
Respuesta a daños en el ADN	<i>GSTP1</i> ^(249,260) , <i>MGMT</i> ^(239,249,250)
Apoptosis	<i>TP73</i> ^(238,241,243,259) , <i>TRAF7</i> ⁽²³¹⁾ , <i>DAL-1</i> ^(106,148) , <i>TIMP-3</i> ^(240,261,262) , <i>NDRG2</i> ⁽²²¹⁾ , <i>RASSF1</i> ^(241,245)

Además, algunas vías de señalización que se han estudiado más ampliamente en el meningioma son la *Hedgehog* (Hh) y la Wnt, si bien también se sabe de la influencia de otras, como la vía Notch, la del factor transformador del crecimiento β (TGF- β) y la vía de señalización del receptor de la insulina^(246,256,263,264).

La vía de señalización Hh está estrechamente relacionada con la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular y la homeostasis de células madre ⁽²⁵²⁾. Se ha estudiado la expresión de diferentes genes de esta ruta y se ha detectado sobreexpresión de los ARNm de *SMO*, *GLI1* y *FOXM1*. Genes que participan en procesos de proliferación celular y migración, como *SPP1* e *IGF2* presentaron sobreexpresión en meningiomas de alto grado ⁽²⁵²⁾. El receptor para los ligandos que activan la vía Hh, *PTCH1*, se ha detectado infraexpresado en meningiomas benignos frente a los de grados superiores, lo que sugiere su implicación en la génesis tumoral más que en la progresión ⁽²⁵²⁾.

También está descrita la implicación de la vía de señalización Wnt en la tumorigénesis de los meningiomas ^(256,265); se ha detectado la pérdida de expresión de E-cadherina mediada por β -catenina. La β -catenina (codificada por *CTNNB1*) tiene una doble función: por un lado actúa como factor de transcripción, por otro, en las uniones célula-célula. Actúa como supresor tumoral, hallándose sus niveles reducidos en meningiomas recidivantes ⁽²⁵⁶⁾. Similares resultados se han encontrado para *SFRP1*, gen que regula a la baja la vía Wnt y se ha demostrado que se infraexpresa en recidivas tumorales en comparación con meningiomas primarios ⁽²⁴⁶⁾.

La vía de señalización Notch también está implicada en la biología de los meningiomas mediante la desregulación de genes de la familia de factores de transcripción Hes bHLH ^(263,266). El papel de Notch en el cáncer es complejo; por una parte, actúa como oncogén promoviendo la tumorigénesis, por otra, en algunos cánceres, como el carcinoma de células basales, actúa como supresor de tumor ⁽²⁶³⁾. Así, la desregulación por inducción de esta vía parece ser un evento frecuente, descrito en más del 40% de los casos, temprano y crítico en la patogenia del meningioma, que además contribuye a la inestabilidad cromosómica en estos tumores ^(263,267).

Se han detectado patrones de expresión alterados en 14 genes implicados en la vía de TGF- β ; la expresión de estos genes muestra diferencias entre los meningiomas de bajo y alto grado ⁽²⁰⁸⁾. El gen *LMO4* (1p22.3) es un candidato novel como diana epigenética en el meningioma. Se detecta silenciado en cerca de un tercio de los casos, aunque parece que este silenciamiento desaparece con la progresión ya que no se detecta en meningiomas recidivados ^(246,264). Se sugiere que *LMO4* modula la señalización de TGF- β a través de la interacción con el receptor SMADs, lo que apoya la

regulación a la baja de esta vía en los meningiomas recurrentes ^(246,268). En conjunto, las alteraciones en esta vía contribuyen a una pérdida de la señalización en meningiomas de alto grado ⁽²⁰⁸⁾.

Diferentes miembros de la familia de señalización de IGF (receptores y proteínas de unión) se han asociado con la progresión de los meningiomas y la vía de las MAPK parece estar expresada constitutivamente en estos tumores ⁽²⁵⁶⁾.

En conclusión, la genética del meningioma es muy compleja y la literatura al respecto refleja su elevada heterogeneidad como se traduce de la diversidad de genes y cromosomas que se encuentran alterados, sin que en los últimos tiempos se haya alcanzado consenso sobre nuevos cambios con valor pronóstico. Existe cierta tendencia en las publicaciones revisadas a señalar la asociación de eventos genéticos con la iniciación tumoral de los meningiomas, mientras que serían eventos epigenéticos los que estarían más implicados en la progresión tumoral de esta neoplasia. Esto incide en la importancia de profundizar en la utilización de nuevas técnicas coste-efectivas que permitan valorar simultáneamente el estado genético y epigenético de los tumores, explorar los mecanismos de iniciación relacionados con *NF2* y aquellos independientes de la pérdida de este gen supresor de tumor, y analizar la alteración de las vías genéticas afectadas durante la progresión de la enfermedad. Además, es necesario recurrir a técnicas de alto rendimiento para explorar diferentes porciones del genoma simultáneamente, debido a la complejidad genética y epigenética de estos tumores.

7 Meningiomas benignos y cambios genéticos desfavorables

Los meningiomas de grado I, considerados de crecimiento lento y curables por cirugía, recidivan hasta en un 20% de los casos, aun cuando la cirugía ha sido radical ^(4,253,255). De hecho, en números absolutos la mayoría de recidivas ocurren en estos meningiomas benignos ⁽²⁵⁵⁾. La gradación de los meningiomas en función de su agresividad se determina, únicamente, en base a parámetros histológicos que incluyen la elevada celularidad, el número de mitosis, la prominencia nucleolar, la necrosis o la invasión de tejido cerebral adyacente ⁽⁴⁾. Así, tumores con morfologías clásicamente

benignas, como son los meningoteliales, fibroblásticos, transicionales, angiomatosos, microquísticos, secretores, ricos en linfoplasmacitos o metaplásicos, pueden considerarse tumores de grado II o III en función de sus características histopatológicas (4,164). No obstante, este sistema resulta insuficiente para predecir la agresividad biológica que presentan algunos tumores histológicamente benignos (120,261) y la obtención de marcadores pronósticos todavía representa un reto en el abordaje de esta patología.

Además, un 5-10% de los pacientes con una resección grado I de Simpson sufren recidivas tumorales, aún en casos con histología benigna, haciendo evidente que la histología, por sí sola, no siempre tiene capacidad predictiva, y enfatizando la importancia de evaluar la agresividad biológica intrínseca en cada caso (3).

En este sentido, las alteraciones citogenéticas y su relación con la agresividad biológica han sido ampliamente estudiadas en los meningiomas, para tratar de predecir este fenómeno de la recidiva tumoral (21,90,113,117,119,120,149). Los cambios en la ploidía se relacionan estadísticamente con peores pronóstico, mayores tasas de recurrencia y características histopatológicas más agresivas inclusive en meningiomas de grado I (54,269,270). Por extensión, la complejidad en el cariotipo se ha relacionado con un peor pronóstico (21,90,119,150). Diferentes estudios han demostrado que las anomalías del cromosoma 1 y la monosomía total o parcial del 14, solas o combinadas, pueden ayudar a predecir la evolución de los tumores, independientemente de su grado histológico, o dicho de otra manera, su presencia en meningiomas benignos se asociaría con un pronóstico desfavorable (104,165,271).

La delección en 1p, que se presenta en cerca de un tercio de los meningiomas de grado I, se detecta en un 11,5% de los tumores de grado I que no recidivan, frente a un 20-25,9% en aquellos que lo hacen (165,261), o según la serie, hasta en el 45% de los casos que recidivan (255). No sólo las delecciones parciales del cromosoma 1 muestran este valor pronóstico: también se ha demostrado la presencia de asociaciones teloméricas como mecanismo que conduciría a la pérdida de material en el cromosoma 1, incluso en este grupo de meningiomas benignos. Así, se sugiere que tanto la inestabilidad telomérica como la centromérica están implicadas en la generación de heterogeneidad cromosómica y en la progresión genética de los meningiomas (136).

Las alteraciones en el cromosoma 14 se relacionan con grados histológicos superiores ^(69,90,98,114,117,131), no obstante su frecuencia en meningiomas benignos que recidivan, alcanza proporciones similares a las que se detectan en meningiomas atípicos (40-57% de los casos) ^(90,94,96,98,99). De hecho, la asociación de monosomía 14 con el tamaño tumoral por encima de los 5 cm, o con edades al diagnóstico por debajo de los 55 años, constituyen marcadores predictivos de la recidiva tumoral a corto y largo plazo, respectivamente ^(165,166). Esto sugiere que la del(14q)/monosomía 14 confiere un fenotipo biológico más agresivo, que en el caso de los meningiomas benignos precedería a las evidencias histológicas de progresión. En definitiva, la pérdida de material genético del cromosoma 14q se asocia con una supervivencia significativamente menor ⁽⁹⁸⁾.

La co-delección en 1p y en el cromosoma 14, descrita en una pequeña proporción de meningiomas histológicamente benignos, confiere un potencial clonogénico agresivo que, independientemente del grado de resección y sin manifestar aumento en los índices proliferativos, demuestra tener valor predictivo de recidiva ^(165,272). Otras alteraciones cromosómicas que se han asociado con las recidivas a corto plazo en meningiomas benignos son las monosomías totales o parciales de los cromosomas 9, 10 y 18 ^(95,165).

Además de la extensa caracterización citogenética que hay en la bibliografía, la necesidad de hallar subgrupos de meningiomas más allá de los subtipos histológicos, ha llevado al estudio de la agresividad metabólica ⁽²⁷³⁾ y molecular en estos tumores. Se ha descrito un metabolismo más agresivo en meningiomas benignos con inestabilidad cromosómica y cariotipos complejos, con niveles aumentados de lactato y disminuidos de creatinina que sugieren un aumento de la glucólisis y de la demanda energética en ellos ⁽²⁷⁴⁾. Los meningiomas benignos con este metabolismo muestran un perfil de expresión génica diferencial, más próximo al de los meningiomas atípicos y, en consecuencia, asociado con el fenómeno de la recidiva tumoral ^(253,274).

Trabajos similares sobre expresión génica detectan 2 subgrupos diferentes de meningiomas con independencia del grado histológico, en los que numerosos genes, muchos de ellos localizados en los cromosomas 1, 6, 9, 10, 14 y 18, se relacionarían con la aparición de recidivas tumorales ^(208,246). No obstante, en ellos la cohorte de meningiomas benignos agresivos no está muy representada.

En líneas generales, todavía no se han descrito, de manera sostenida, genes supresores de tumor implicados en la agresividad de los meningiomas benignos. No se dispone de un sistema que incluya las características genéticas y clínico-biológicas en los pacientes con meningioma, que permita predecir qué tumores adoptarán un comportamiento agresivo dentro de este grupo de meningiomas.

Así pues, el estudio del perfil genético/epigenético de meningiomas grado I y su asociación con las características citogenéticas, resulta relevante de cara a establecer asociaciones con los parámetros clínicos y, de ese modo, identificar diferencias robustas entre los tumores que presentarán realmente un comportamiento benigno frente a aquellos que biológicamente resultarán más agresivos.

8 Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación

Existen múltiples metodologías para detectar variaciones en el número de copias (VNC) de genes implicados en la biología de los tumores humanos: la hibridación “*in situ*” de fluorescencia (FISH), la hibridación genómica comparada (CGH) o los estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH) son los más habituales.

La amplificación de sondas múltiple dependiente de ligación (MLPA, *Multiplex ligation-dependent probe amplification*), por su parte, es un método novedoso que permite estudiar en detalle regiones predefinidas por su implicación patológica, o estudiar simultáneamente múltiples genes. La MLPA no abarca la gran cantidad de genes que incluyen los *microarrays*, pero permite estudiar de una manera más dirigida hasta 50 regiones genómicas de interés, simultáneamente. Además, ha demostrado ser sensible y sencilla para la detección de alteraciones que escapan a otros métodos de *screening*, ya que el cambio de número de copias de uno o más exones en un gen no suele ser detectable por secuenciación, debido a que la presencia del alelo sano enmascara la ausencia de la otra copia.

En los últimos años se ha desarrollado una variante, la MS-MLPA (MLPA de Metilación Específica), que permite estudiar, en paralelo a la VNC, el estado de metilación de parte de los genes incluidos en la selección de cada ensayo.

La MLPA es una técnica que no sólo aporta novedades en investigación básica, sino que también ha mostrado su aplicabilidad en la clínica. Hoy en día se usa en los centros de referencia del Sistema Nacional de Salud en la evaluación de enfermedades genéticas, por ejemplo para descartar la diabetes tipo MODY o el cáncer colorrectal hereditario no polipósico. Además, se utiliza ante la sospecha clínica de numerosos síndromes genéticos hereditarios. Esto pone de manifiesto el interés y la fiabilidad que hay tras la MLPA, que en pocos años se ha posicionado en la práctica clínica diaria, a diferencia de otros tipos de ensayos más orientados al estudio de niveles de mRNA, como la PCR a tiempo real o los *microarrays* de expresión.

En el caso concreto de los meningiomas, la MLPA ha demostrado ser una técnica capaz de detectar alteraciones en *NF2* que escapan a otros métodos (como son las deleciones totales, parciales o las duplicaciones), en un 74% de los casos con tumores esporádicos y familiares ⁽²⁷⁵⁾. También se ha analizado el estado de *EGFR* en meningiomas mediante esta técnica, mostrando la ausencia de ganancias o de amplificación, en comparación con gliomas ⁽²⁵¹⁾.

Hay dos trabajos previos en los que se utiliza la tecnología de MS-MLPA para analizar las variaciones en número de copias (VNC) y en la metilación de genes supresores de tumor (TSG) en meningiomas, si bien en ambos el número de casos analizados es muy pequeño, con 15 y 42 muestras respectivamente ^(258,276). En ellos, se detectan deleciones en TSG, y aunque con menor frecuencia, como cabe esperar al estudiar supresores tumorales, también encuentran duplicaciones en 1p36, 8q24, 9q, 10q, 12q y 17q ⁽²⁵⁸⁾. Ewald *et al.* detectan la deleción en *VHL* como la más frecuente, hecho que no había sido descrito anteriormente. *VHL* codifica parte de una ubiquitin-3-ligasa que participa en el metabolismo del factor inducible por hipoxia HIF-1, y parece estar relacionado con la neoangiogénesis habitual en los meningiomas. Además, las pérdidas en *VHL* se relacionaron con la presencia de edema peritumoral ⁽²⁷⁶⁾. Se describe también la hipermetilación en *RASSF1* y, por primera vez, en los genes *ESR1* y *WT1* en un 20% de las muestras analizadas ⁽²⁷⁶⁾. Martínez-Glez *et al.* describen mayores tasas de hipermetilación, que afectaba a los genes *CDKN2B* y *RASSF1* en el 50% de los casos, y en cerca del 10% en *CDH13*, *IGSF4*, *CASP8*, *CDKN1B*, *PTEN* y *CHFR* ⁽²⁵⁸⁾. Cabe señalar que estos trabajos que utilizan MLPA y MS-MLPA en meningiomas, lo hacen sobre tumores en fresco.

Por otra parte, diferentes publicaciones han demostrado la aplicabilidad de la MS-MLPA sobre material incluido en parafina ^(262,277), aunque, hasta la fecha, ninguno ha estudiado el meningioma; determinar la utilidad de estos kits sobre material fijado e incluido tiene un gran potencial práctico ya que la inclusión en parafina es la forma mayoritaria de conservación de tejidos en los servicios de Anatomía Patológica. Todos estos hallazgos enfatizan la utilidad de la MS-MLPA en la investigación de los mecanismos epigenéticos que participan en la agresividad biológica de los meningiomas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 Hipótesis

Los meningiomas son los tumores intracraneales más frecuentes. Generalmente son benignos aunque algunos de ellos recidivan, lo que supone una importante complicación en el curso clínico del paciente. Pese a la estrecha asociación entre el grado histopatológico y el pronóstico de la enfermedad, estos tumores presentan un comportamiento clínico y evolutivo heterogéneo. Los meningiomas de grado I son los más frecuentes por lo que, en números absolutos, son los que más recidivan.

Los estudios citogenéticos señalan que la pérdida total o parcial del cromosoma 22 es el primer acontecimiento genético en el desarrollo de los meningiomas, y el gen *NF2* es el único que, por el momento, ha demostrado su implicación en su patogénesis. La mayor complejidad cariotípica se ha relacionado, generalmente, con grados histológicos II y III y, por tanto, con un comportamiento clínico más agresivo.

Se han analizado numerosos genes en los meningiomas, si bien no hay consenso sobre su implicación en la capacidad de recidivar de estos tumores. Este hecho, unido a la gran heterogeneidad que presentan los meningiomas, enfatiza la necesidad de recurrir a técnicas que permitan estudiar cambios genéticos distribuidos a lo largo de todo el genoma, como la MLPA. Resulta interesante poder estudiar simultáneamente las modificaciones epigenéticas que ayuden a explicar el comportamiento biológico del meningioma. El uso de esta técnica permite además, analizar muestras parafinadas, lo que incide en el interés de su utilización en estos tumores, de cara a su posible incorporación en la práctica clínica rutinaria.

Actualmente, existen pocos criterios para predecir qué tumores presentan un mayor riesgo de recidivar, especialmente en el caso de los meningiomas benignos; es escaso el conocimiento sobre su agresividad biológica intrínseca, a pesar de su frecuencia y de su especial localización. Todos estos hechos enfatizan la necesidad de estudiar de manera dirigida, genes candidatos que influyan en la agresividad tumoral, con el fin de perfilar eficazmente el comportamiento biológico de estos tumores genéticamente heterogéneos y mejorar sus opciones terapéuticas.

2 Objetivos

1. Analizar los siguientes parámetros clínicos: sexo, edad al diagnóstico, localización, tamaño tumoral, cirugía y supervivencia libre de recidiva en 101 pacientes diagnosticados con meningioma.
2. Caracterizar, con criterios histopatológicos, 120 tumores de estos pacientes, de los cuales 92 son tumores primarios y 28 tumores recidivados.
3. Establecer, mediante estudios citogenéticos clásicos y por iFISH, los patrones cromosómicos de los meningiomas primarios y recidivados, y relacionarlos con la iniciación y progresión del tumor.
4. Analizar, a nivel molecular, las deleciones producidas en los diferentes dominios del gen *NF2* y su implicación en la iniciación tumoral.
5. Valorar el estado alélico de genes supresores de tumor mediante MLPA en meningiomas primarios y recidivados, así como en función del grado histológico de los tumores, para establecer diferentes grupos genéticos.
6. Determinar la inactivación epigenética de genes supresores de tumor y su papel durante la progresión tumoral, en meningiomas primarios y recidivados.
7. Valorar, en los meningiomas de grado I, las alteraciones genéticas que aparecen en los tumores primarios que recidivaron frente a los que no lo hicieron, para poder establecer perfiles genéticos y epigenéticos que puedan asociarse con la agresividad biológica de los meningiomas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material de estudio de este trabajo consistió en 120 meningiomas procedentes de 101 pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) y remitidos al Servicio de Anatomía Patológica (AP) para su diagnóstico. El estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético de la Universitat de València y el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia (CEIC).

Los estudios realizados en este trabajo comprenden:

- Estudio clínico de los pacientes.
- Estudio histopatológico de los tumores, que incluye la construcción de micromatrices tisulares y el estudio de marcadores de proliferación.
- Estudio citogenético, que comprende la elaboración mediante técnicas de citogenética clásica del cariotipo y su formulación, y el estudio con técnicas de citogenética molecular de hibridación “*in situ*” de fluorescencia de los cromosomas más frecuentemente implicados en la iniciación y progresión de los meningiomas.
- Estudio genético y epigenético de las muestras, que incluye la extracción, valoración y optimización del ADN, la amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA) y la amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación específica para metilación (MS-MLPA).
- Estudio estadístico para la valoración de los hallazgos histopatológicos, citogenéticos, genéticos y epigenéticos en esta serie de casos.

1 Estudio clínico

Se han estudiado 120 tumores procedentes de 101 pacientes, que incluyen 92 meningiomas primarios y 28 recidivas tumorales. Los tumores fueron recogidos principalmente entre los años 2008 y 2010, para garantizar un periodo de seguimiento mínimo de 5 años. Además, se incluyeron los tumores primarios de pacientes que sufrieron recidivas durante este periodo.

Para el estudio clínico de los casos, se revisaron los historiales médicos de los 101 pacientes incluidos en el estudio, que se encontraban en el Archivo Central del HCUV. El protocolo de recogida de información clínica incluyó las siguientes características: el

sexo y la edad al diagnóstico de los pacientes, el síntoma inicial de debut de la enfermedad, la localización y el tamaño del tumor, la radicalidad de la cirugía, el tiempo de recidiva/s cuando la/s hubo, la fecha de *exitus* cuando se dio el caso y, por último, el tiempo de supervivencia libre de enfermedad o el periodo de control. A continuación se detallan los criterios adoptados para la valoración de los diferentes parámetros clínicos:

- **Sexo y edad:** se incluyó el sexo de los pacientes y la edad al diagnóstico, considerando el tiempo en años, transcurrido desde la fecha de nacimiento hasta la fecha del informe del Servicio de Anatomía Patológica con el diagnóstico definitivo.

- **Síntoma inicial:** principal problema de salud que llevó a los pacientes a la solicitud de un examen médico y que condujo, en último término, al diagnóstico del tumor. Los síntomas de debut de la enfermedad se clasificaron por sus características en 8 grupos diferentes:

1. Cefalea como síntoma único o como síntoma combinado con otros.
2. Hipertensión endocraneal no asociada a cefalea.
3. Desorientación temporo-espacial.
4. Déficits sensoriales, que afectan al oído, olfato y/o al gusto, con especial mención de los déficits visuales.
5. Déficits neurológicos.
6. Déficits motores.
7. Crisis tónico-clónicas.
8. Hallazgos casuales, que se refiere tanto a los tumores diagnosticados como consecuencia de un ingreso fortuito o como consecuencia del control de otra patología.

- **Localización del tumor:** En una primera división distinguimos tumores encefálicos de aquellos de localización espinal. A su vez, los tumores encefálicos se clasificaron en tumores supratentoriales, tumores de la base del cráneo y tumores de la fosa posterior. Los meningiomas supratentoriales se clasificaron en tumores de la convexidad, tumores parasagitales y tumores ventriculares; dentro de los tumores de la convexidad, se detalló el lóbulo afectado: frontal, parietal, occipital, temporal o combinaciones de ellos cuando la ubicación de la masa tumoral era limítrofe entre dos

lóbulos. Los meningiomas de la base del cráneo incluyeron los tumores ubicados en el ala esfenoidal, el surco olfatorio, la silla turca y el área petroclival. Los tumores infratentoriales incluyeron los meningiomas que se originaron en la fosa posterior, la región tentorial y los del ángulo pontocerebeloso.

- **Tamaño tumoral:** Se estableció el diámetro mayor de la masa tumoral, en centímetros, como definitoria del tamaño tumoral. El dato se obtuvo siempre que fue posible de los informes radiológicos de los exámenes del paciente (TAC o RM) o, en su defecto, de las observaciones realizadas tras la resección de las masas tumorales.

- **Cirugía:** Basándonos en la intervención quirúrgica y en las pruebas radiológicas postquirúrgicas clasificamos la radicalidad de la cirugía en función de los grados de Simpson. Se consideraron resecciones completas las que se encuadraron en los grados I y II de Simpson y resecciones subtotales las de grados superiores ⁽³¹⁻³³⁾.

- **Tiempo de supervivencia libre de enfermedad:** Período de tiempo sin detección de recidiva; comprendió desde el diagnóstico del tumor hasta la fecha de control o hasta la fecha de *exitus* en los pacientes que fallecieron.

- **Tiempo de recidiva:** Tiempo en meses desde la intervención quirúrgica del meningioma primario hasta la detección radiológica de la presencia de recidiva tumoral.

- **Exitus:** Fecha de fallecimiento del paciente, bien como consecuencia de la enfermedad o de la intervención quirúrgica, o bien por muerte natural. Se expresa en meses desde el diagnóstico del tumor primario.

2 Métodos

2.1 Recogida de muestras

En colaboración con el Servicio de Neurocirugía del HCUV se estableció el protocolo de recogida de las muestras de los tumores. Tras la intervención quirúrgica y la descripción macroscópica de la lesión, se procedió a:

- La recogida en fresco de un fragmento, en un período no superior a 30 minutos tras la extracción para su criopreservación.
- La recogida en fresco de un fragmento, en un tubo estéril con medio de RPMI suplementado con antibióticos. Se realizó en los casos en que el tamaño tumoral era suficiente para no comprometer el diagnóstico, y poder así destinarlo a su cultivo “*in vitro*” en un período no superior a 24h, de cara a realizar el estudio citogenético clásico.
- La fijación de la muestra en formaldehído al 4% para su tallado y posterior inclusión en parafina, en un periodo de 24-48h, a fin de realizar el diagnóstico histopatológico. Sobre este material se procedió a la construcción de micromatrices tisulares y a los diferentes estudios genéticos y de citogenética molecular.
- La localización de los bloques de parafina necesarios, en el Archivo del Servicio de AP del HCUV, y los resultados de los informes de Anatomía Patológica.

2.2 Técnicas histopatológicas

Se realizaron sobre el material tumoral incluido en parafina. Los tumores se diagnosticaron y clasificaron en función del patrón histológico y del grado de agresividad tumoral que presentaban. Atendiendo a su morfología y aplicando los criterios de la OMS (tablas 1 y 2) se clasificaron como tumores de grado I o benignos, grado II o atípicos y grado III o anaplásicos. Consideramos como criterios principales, la pérdida del patrón estructural (*sheeting*), la prominencia nucleolar, el número de mitosis en 10 HPF, la presencia de micronecrosis y la infiltración del tejido nervioso. Se consideraron el pleomorfismo nuclear y la hiperplasia vascular como criterios menores.

Los bloques de parafina de los tumores se seccionaron con un micrótopo Leica RM2245 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) en cortes de 5 μm y se montaron en portaobjetos tratados previamente con Poly-L-lisina (Merck, Darmstadt, Alemania) para mejorar la adherencia de las muestras. Para el estudio morfológico se realizó la tinción estándar de hematoxilina-eosina, siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- Desparafinación e hidratación: Introducir las preparaciones en estufa a 60°C durante 30 minutos. Pasar por 3 baños de xilol, 10 minutos cada uno. A continuación, pasar por alcohol a 98%, 80% y 70%, 10 minutos en cada uno. Lavar en agua destilada.

- Coloración: aplicar hematoxilina de Harris (Merck) durante 5 minutos y lavar en agua. Diferenciar con alcohol clorhídrico al 0,5%, lavar con agua corriente y neutralizar la acción del clorhídrico fijando la coloración con hidróxido de amonio (Merck). Lavar con agua corriente. Aplicar eosina (Merck) durante 2 minutos. Lavar con agua.

- Deshidratación y montaje: Pasar por alcoholes en graduación ascendente (70%, 80% y 98%) 3 minutos cada uno. Pasar por 3 baños de xilol, de 10 minutos cada uno. Montar con Entellan® (Merck) y cubreobjetos para su adecuada conservación.

2.3 Construcción de micromatrices tisulares o *Tissue Micro Arrays* (TMAs)

Las micromatrices tisulares constituyen una excelente herramienta para el estudio retrospectivo de material incluido en parafina. Se trata de un método que permite incluir en un solo bloque -bloque receptor- un elevado número de muestras procedentes del mismo o de diversos orígenes, y de controles, y así someterlas simultáneamente y de manera más homogénea a las diferentes técnicas de laboratorio ⁽²⁷⁸⁻²⁸⁰⁾. Para su construcción, se utilizó el método de Hidalgo *et al.* ⁽²⁸⁰⁾ con una variación específica en el tamaño de los cilindros insertados para aumentar la capacidad de la micromatriz. Se seleccionaron los tumores incluidos en parafina a introducir en la micromatriz; sobre sus respectivas hematoxilinas-eosinas se identificaron regiones representativas del tumor y se tomaron 4 muestras cilíndricas de cada uno de los casos, con 0,8 mm de diámetro y 3 mm de profundidad. Por último, se introdujeron los cilindros en un bloque receptor -bloque de parafina vacío-. Esta construcción supone una superficie de estudio de 2 mm² de cada tumor, que incluye 4 regiones representativas de cada muestra. Para

la construcción del TMA utilizamos un *Manual Tissue Arrayer I* (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EEUU) y el proceso seguido fue el siguiente:

- Diseñar una plantilla guía con la posición que ocupa cada uno de los cilindros de cada muestra en nuestra matriz tisular.
- Preparar el bloque receptor, desbastándolo para que quede la superficie lisa. Colocar en la base del instrumento y fijarlo.
- Seleccionar el juego de agujas, en este caso de 1 mm de diámetro, para perforar el bloque receptor, y una aguja de 0,8 mm para tomar la muestra del donante. De esta manera se garantiza que el cilindro que se toma del donante, entrará bien en el receptor. Ajustar a cero las coordenadas del *Tissue Arrayer*.
- Perforar el bloque receptor, aproximadamente 3 mm y eliminar la parafina. Cambiar de aguja, colocar el bloque donante sobre el puente y tomar la muestra tumoral en la región indicada. Retirar el puente e introducir la muestra en el bloque receptor.
- Desplazarse sobre el bloque receptor 4 mm y hacer un nuevo hueco. Así sucesivamente hasta introducir todos los casos que forman la matriz, siguiendo las posiciones diseñadas previamente en la plantilla guía y manteniendo así la identificación de las muestras.

Una vez acabada la construcción, llevar el bloque receptor a estufa, a 37°C / 24h para que la parafina de los cilindros se fusione con la del bloque nuevo. El bloque, una vez atemperado, permite trabajar con él como con un bloque normal; se hicieron secciones seriadas con el micrótopo y se recogieron en portaobjetos polilisinizados. Una sección se tiñó con hematoxilina-eosina, siguiendo el protocolo antes indicado, para controlar la idoneidad y las características morfológicas de la región escogida e insertada, así como para realizar el estudio del índice mitótico (figura 8).

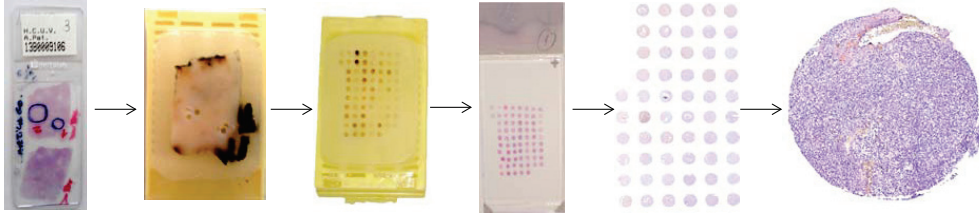


Figura 8. Esquema de las etapas seguidas para el estudio histopatológico. Selección de la región de interés, construcción de la micromatriz, sección de la micromatriz y tinción, fotografiado de los TMAs y valoración de cada uno de los cilindros obtenidos.

2.4 Valoración del número de mitosis

Una vez obtenidas las secciones de los TMAs, se confirmó la histopatología y se estudió en ellas la proliferación celular a través del índice mitótico. Para ello, se contó el número de mitosis en los diferentes cilindros de cada muestra: dado que el meningioma es un tumor, en general, poco proliferante, se valoraron 20HPF, distribuidos al azar a lo largo de los 4 cilindros representativos de cada tumor.

2.5 Estudio inmunohistoquímico

Sobre las secciones de las micromatrices tisulares, utilizamos el método enzimático indirecto de la avidina-biotina-peroxidasa descrito por Hsu SM *et al.* con modificaciones (281). El protocolo seguido fue el siguiente:

- **Desparafinación e hidratación:** Calentar los cortes. 60°C durante 30 minutos, seguido de 3 pasos de 5 minutos en Xilol; 3 pasos en alcoholes graduales (98%, 80% y 70%) de 5 minutos cada uno. Lavar con agua destilada.
- **Desenmascaramiento antigénico:** Tratar las preparaciones durante 3 minutos a una sobrepresión de 1,5 atmósferas en Microclave (J.P. Selecta, Abrera, Barcelona, España) sumergidas en una solución tamponadora (tampón citrato a pH=6). Refrigerar las muestras en baño frío con agua corriente y eliminar el tampón citrato lavando con agua destilada.
- **Inhibición de la actividad peroxidasa endógena:** A fin de impedir reacción cruzada con el sistema de revelado de la técnica, incubar con H₂O₂ al 3% en metanol, durante 30 minutos y en oscuridad. Lavar con agua destilada.

- Incubación con los anticuerpos primarios:
 - Secar bien y circular las preparaciones con Sigmacote® (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, EEUU) para aplicar las soluciones de anticuerpos.
 - Preparar cada anticuerpo a la concentración adecuada con el diluyente comercial ChemMate™ Antibody Diluent (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), aplicar sobre la preparación e incubar a temperatura ambiente 1h. Lavar 3 veces con tampón TBS-T (Dako).
- Incubación con el anticuerpo secundario: Aplicar 23 gotas de anticuerpo comercial HRP anti ratón/conejo e incubar a temperatura ambiente 30 minutos. Lavar 3 veces con tampón TBS-T (Dako).
- Revelado con diaminobencidina (DAB): Aplicar 200 µL de solución DAB sobre cada muestra durante unos segundos. Lavar rápidamente con agua destilada.
- Contraste, deshidratación de las muestras y montaje: Introducir las preparaciones en hematoxilina de Harrir (Merck) durante 20 segundos. A continuación, deshidratar con 3 pases de 5 minutos en alcoholes de 70%, 80% y 98% y 3 pases de 5 minutos cada uno en xilol. Dejar las preparaciones en xilol y, de una en una, añadir una gota de Entellan® (Merck) y montar con cubreobjetos de 24x60 mm.

Se utilizó el anticuerpo Ki-67/MIB-1 (Dako) a una concentración de 1/200, como marcador de proliferación ya que Ki-67 es una proteína nuclear presente durante las fases activas del ciclo celular.

La valoración de los resultados se realizó examinando los cuatro cilindros de 0.8mm de diámetro de cada caso, lo que supone un área total de 2mm²/caso. Se determinó el número de núcleos positivos y se estratificó como:

- Índice de proliferación bajo=1 (<1% de núcleos positivos)
- Índice de proliferación moderado=2 (1-5% de núcleos positivos)
- Índice de proliferación alto=3 (5-20% de núcleos positivos)
- Índice de proliferación muy alto=4 (>20% de núcleos positivos)

Por un lado, se calculó el valor medio de expresión de Ki-67 en los cuatro cilindros y, por otro, el valor máximo de expresión, de cara a relacionarlo con la evolución de los pacientes y con el riesgo de recidiva ^(3,34,65).

2.6 Estudio citogenético clásico. Cultivo “*in vitro*” y estudio del cariotipo

2.6.1 Recogida de muestras para cultivo

Cuando el tamaño tumoral lo permitió, un fragmento del tumor en fresco se remitió al Laboratorio de Cultivos Celulares del Departamento de Patología para su procesamiento, con la finalidad de aumentar la cantidad de células, para la realización de técnicas citogenéticas (obtención del cariotipo) así como para la observación de su morfología y crecimiento “*in vitro*”.

Las muestras fueron recogidas en condiciones de asepsia en tubos estériles de fondo redondo (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con medio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) (Gibco BRL, Grand Island, Nueva York, EEUU), suplementado con mezcla antibiótica al 2% de penicilina y estreptomomicina (Gibco BRL) y 0,05 mg/mL de sulfato de gentamicina (Merck). Los tubos de recogida con las muestras tumorales, permanecieron a 4°C durante un periodo máximo de 16h hasta el momento del procesamiento de los tumores.

2.6.2 Procesamiento de las muestras

La manipulación de las muestras y de los cultivos se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, en la zona destinada a tal fin del Laboratorio de Cultivos, en una cabina de flujo laminar Bio II A (Telstar LifeScience, Madrid, España). La Unidad de Cultivos Celulares y Citogenética del departamento de Patología de la UV es apta para el procesamiento, manipulación y cultivo de muestras biológicas, y tiene los permisos pertinentes para ello (ATCC # SP-580).

Para la obtención de cultivos celulares “*in vitro*” el protocolo seguido fue el siguiente:

- Trasvasar la biopsia a una placa de Petri, realizar 2 lavados sucesivos con solución salina de fosfato tamponada (PBS) (Gibco BRL), y disgregar mecánicamente con ayuda de un bisturí.

- Introducir en un tubo con medio completo: RPMI - 1640 suplementado con: 20% suero bovino fetal (SBF), 200 mM L- glutamina, 50 µg/mL penicilina y 50 µg/mL sulfato de estreptomicina y 0,2% de colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich); incubar 20 minutos a 37°C en baño termostático para permitir la digestión enzimática.

- Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.

- Retirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 8 mL de medio completo.

- Repetir esta centrifugación y resuspensión 2 veces más para eliminar cualquier resto de la enzima.

- Sembrar en frascos de 25 cm² (Nunc), y llevar al incubador a 37°C con un 5% de CO₂ en el aire.

El medio de cultivo se cambió 2-3 veces por semana en función de las necesidades de las células, que fueron observadas a diario y fotografiadas a diferentes aumentos con un microscopio Axiovert 135 (Carl Zeiss, Alemania). Cuando un cultivo alcanzaba un índice mitótico adecuado, se procedía a su sacrificio para la obtención de cromosomas metafásicos con los que realizar el cariotipo. Cuando fue posible y se alcanzaba la semiconfluencia, se procedió a subcultivar o a su crioconservación.

2.6.3 Protocolo para el subcultivo (Técnica de Doblaje)

Para conseguir material de estudio en cantidad suficiente, los cultivos se propagaron "in vitro". Para ello el proceso realizado fue el siguiente:

- Retirar el medio del frasco.
- Con PBS (sin calcio ni magnesio) a pH=7, lavar suavemente el fondo del frasco.
- Añadir 2,5 mL de tripsina-EDTA (Gibco BRL), moviendo el frasco, y retirar la cantidad suficiente para que quede el fondo cubierto con la solución; mantener 5 minutos a 37°C.
- Con el microscopio de contraste de fases comprobar que las células se han despegado del fondo del frasco.

- Neutralizar la tripsina-EDTA con 6 mL de medio completo, agitar para separar los posibles agregados de células y centrifugar a 1200 rpm durante 7 minutos.
- Añadir 4 mL de medio completo, resuspender y repartir en 2 frascos nuevos.
- Llevar al incubador y controlar al día siguiente la adhesión de las células al fondo de los frascos.

2.6.4 Crioconservación de las células en cultivo

Es conveniente conservar células de distintos pases de los cultivos con el fin de disponer de material sobre el que realizar estudios posteriores. El momento óptimo es cuando presentan aproximadamente un 80% de la confluencia. Para tal fin, las células se despegaron del fondo del frasco de igual manera que para subcultivarlas y, tras el primer lavado con medio completo, que permite eliminar el exceso de tripsina-EDTA, se resuspendieron en 1 mL de medio completo suplementado con un 5% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). Se llevaron a atmósfera de nitrógeno 2h y posteriormente se procedió a su almacenamiento en un tanque con nitrógeno líquido (a -196°C).

2.6.5 Descongelación de las células

Cuando se necesitaron células para la realización de los estudios citogenéticos, se procedió a descongelar los viales mantenidos en nitrógeno líquido. Para ello, se extrajeron las ampollas que rápidamente se introdujeron en un baño a 37°C hasta que su contenido pasó a fase líquida. En ese momento se roció la ampolla con alcohol de 70° , se dejó evaporar éste y se procedió, rápidamente, a trasvasar el medio con las células a un tubo cónico con 8 mL de medio completo. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, y el sedimento celular se resuspendió en 4 mL de medio completo. Se sembró en un frasco Falcon de 25cm^2 y se llevó al incubador a 37°C y atmósfera controlada. Al día siguiente se observaba el cultivo con el microscopio de contraste de fases y, en caso de ser necesario, se cambiaba el medio.

2.6.6 Sacrificio celular y preparación de extensiones cromosómicas

Cuando se observó en el cultivo un índice mitótico adecuado y una cantidad de células suficiente, se procedió al sacrificio celular para la obtención de metafases. Para ello el protocolo seguido fue el siguiente:

- Añadir al cultivo Colcemid 0,01% (Gibco BRL) e incubar 2h a 37°C.
- Lavar con PBS para, a continuación, levantar las células con 2,5 mL de tripsina-EDTA (Gibco, BRL), trasvasarlas a un tubo de fondo cónico (Nunc) y centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir una solución hipotónica de KCl 0,075M, en agitación, para hinchar las células y permitir la separación de los cromosomas. Incubar 15 minutos a 37°C y centrifugar 5 minutos a 1200 rpm. Retirar el sobrenadante.
- Añadir fijador de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1) por goteo en agitación. Mantener a 4°C durante 20 minutos y centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y añadir de nuevo Carnoy, centrifugar y conservar a -20°C hasta el momento de realizar las extensiones.

Para realizar las extensiones se atemperaron los tubos procesados y se retiró el Carnoy dejando sólo 0,5 mL. Se resuspendió cuidadosamente y se dejó caer una gota de la suspensión celular sobre un portaobjetos mojado en agua a 4°C permitiendo que la gota de suspensión se extendiera suavemente con el fin de que las membranas celulares se rompieran liberando los núcleos en interfase y los cromosomas metafásicos.

2.6.7 Obtención de bandas G

Para realizar el bandeado, las preparaciones se envejecieron a temperatura ambiente durante 7 días, o en calor seco a 60°C por 24h. El protocolo llevado a cabo tras el envejecimiento de la extensión citogenética, fue el siguiente:

- La preparación envejecida es sometida a una digestión enzimática suave en tripsina 0,25% en una solución salina isotónica (PBS) durante aproximadamente 2-3 segundos.
- Lavar con agua corriente y observar el estado de las metafases al microscopio; secar al aire.

- Teñir las preparaciones con solución de Giemsa al 10% en tampón McIlvaine (pH=6,8) durante 5 minutos. Lavar de nuevo con agua corriente y dejar secar.
- Las extensiones citogenéticas se observaron en un microscopio Leica DM-RB (Leica Microsystems GmbH) con cámara fotográfica incorporada y asociado a un ordenador con el *software* Leica Chantal de análisis de metafases. Se contaron el mayor número posible de metafases, para la obtención de la ploidía y del número modal. En las mitosis observadas, se ordenaron los cromosomas, se confeccionó el cariotipo y se describió su composición de acuerdo a las normas de formulación cariotípica recogidas en el Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética de 2009 ⁽²⁸²⁾.

Se define clon como una población celular derivada de una única célula progenitora. Aunque, en general, tienen un complemento cromosómico próximo, los clones no son necesariamente homogéneos y pueden estar formados por subclones que hayan evolucionado con cierta independencia durante el desarrollo tumoral ⁽²⁸²⁾. Las anomalías cromosómicas se consideraron clonales cuando se repetían, al menos dos veces en el caso de las anomalías estructurales o ganancias cromosómicas y al menos tres veces en el caso de las pérdidas de cromosomas enteros ⁽²⁸²⁾.

2.7 Estudio de citogenética molecular. Hibridación “*in situ*” de fluorescencia en núcleos en interfase (iFISH)

La técnica de iFISH permite determinar variaciones en el número de copias (VNC) de un determinado *locus* cromosómico. En esta técnica se hibrida una sonda marcada con fluorescencia, complementaria a la región del ADN a estudiar. Gracias al tratamiento al cual se somete la muestra, el ADN de los núcleos celulares se desnaturaliza, y queda expuesto para la hibridación con la sonda marcada (figura 9). El resultado es un número de señales fluorescentes en cada núcleo, que dependerá del estado alélico de la región estudiada. En este estudio, sobre las secciones de 5 μm de los TMAs obtenidos, se aplicaron diferentes sondas de FISH para determinar el estado de los cromosomas más implicados en la iniciación y progresión de los meningiomas:

- El cromosoma 22, por la localización del gen *NF2* en él y su implicación en la génesis de los meningiomas ⁽⁸¹⁾. Utilizamos la sonda LSI 22q12 (Vysis, Abbot científica, Madrid, España). Como control, se estableció el *cut-off* en 3 muestras de tejido cerebral no tumoral ⁽⁶⁹⁾.

- El brazo corto del cromosoma 1, por su implicación en la iniciación y en la agresividad biológica de los meningiomas. Utilizamos la sonda LSI 1p36/ LSI 1q25 (Vysis) en la que la región diana es la 1p36 y la región 1q25 actúa como control.

- El brazo largo del 14, también por su implicación en la agresividad biológica de los meningiomas ⁽¹⁰⁴⁾. Utilizamos la sonda t(11;14) *CCND1/IGH* (Vysis), en la que *IGH* del brazo largo del cromosoma 14, actúa como diana y el gen *CCND1* en el cromosoma 11, como control.

Las regiones de complementariedad de las sondas FISH se muestran en la figura 10.

2.7.1 Protocolo para la iFISH

Desparafinación e hidratación:

- Introducir las secciones de TMA en la estufa durante toda la noche a 42°C.
- Realizar 3 pases en xilol de 5-10 minutos cada uno y 2 pases en alcoholes a concentración decreciente para hidratar de 5 minutos cada uno.

Pretratamiento:

- Lavar las muestras en una cubeta Coplin con tampón de lavado (Dako) brevemente. Cambiar a otra cubeta Coplin con tampón de pretratamiento que estará al baño maría a 97±2°C, 10 minutos. Enfriar las preparaciones a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces / 3 minutos. Secar bien.

Digestión enzimática:

- Aplicar pepsina fría durante 10 minutos. Lavar 2 veces, 3 minutos.
- Deshidratar con alcoholes a concentración creciente, 70% 85% 96% 2 minutos en cada uno. Secar al aire.
- Preparación de la sonda:

- 7 μ L de tampón hibridación
- 2 μ L de agua desionizada
- 1 μ L de sonda

Desnaturalización e hibridación:

- Poner 10 μ l de la mezcla de sonda en el centro de la muestra.
- Cubrir con cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire.
- Sellar con pegamento e incubar toda la noche. El programa es: T 82°C, 5 minutos + 45°C, durante un mínimo de 16h.
- Sacar las muestras y retirar el cubreobjetos sumergiendo en tampón de astringencia (Dako) a temperatura ambiente.
- Lavar de nuevo en tampón de astringencia a 65°C, 10 minutos.
- Lavar 2 veces 3 minutos en tampón de lavado (Dako).

Contratinción y montaje:

- Deshidratar con alcoholes a concentración creciente 70%, 85% y 96% y secar al aire.
- Contrateñir los núcleos celulares con DAPI (Vysis), que emite en azul, colocar el cubreobjetos y sellar.

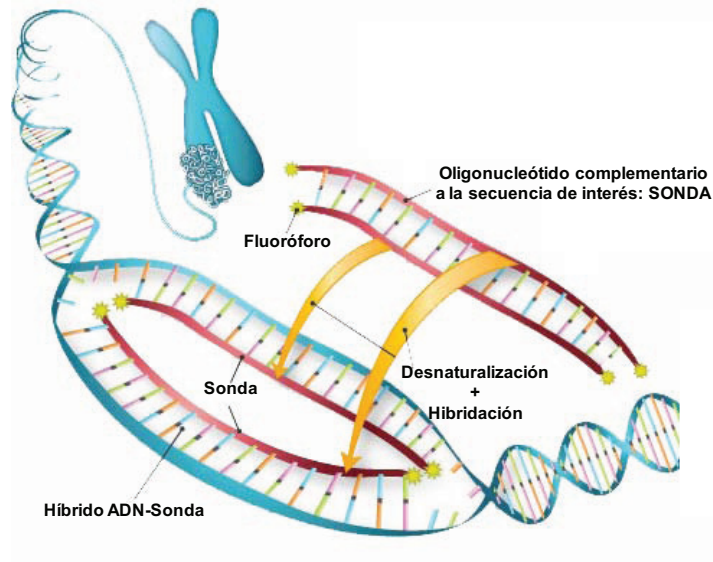


Figura 9. Representación del fundamento de la hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH). Se muestra como una sonda de ADN, marcada con fluorescencia, se desnaturaliza e hibrida sobre una muestra de ADN previamente desnaturalizada. El resultado son señales fluorescentes en las regiones de complementariedad entre la sonda y el ADN diana. Modificado de www.semrock.com/fish.aspx.

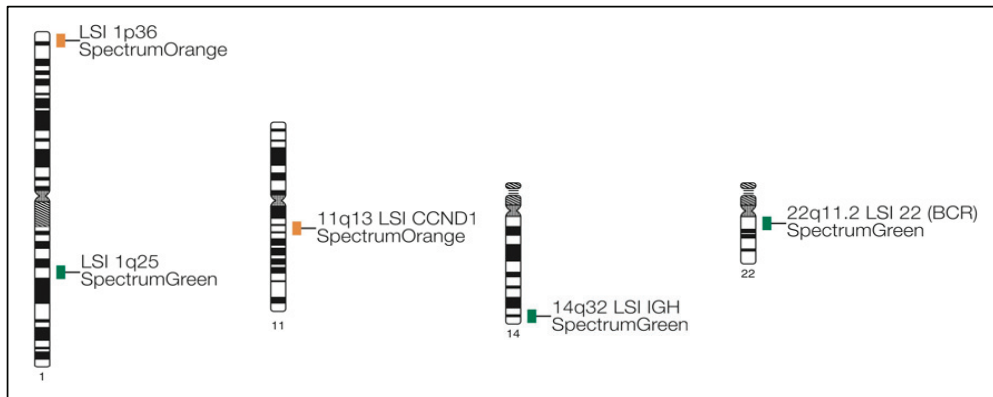


Figura 10. Diagrama representativo de las regiones estudiadas con las distintas sondas de FISH utilizadas. Con la sonda LSI 1p36/ LSI 1q25 determinamos las deleciones en 1p36 por comparación con el estado de la región 1q25. Con la sonda t(11;14) CCND1/IGH analizamos las deleciones que afectan a 14q36 por comparación con el estado del cromosoma 11. La sonda 22q11.2 nos indica la monosomía total o parcial del cromosoma 22, y se hibrida independientemente por lo que se aplican los *cut-offs* establecidos en la bibliografía⁽⁶⁹⁾.

2.7.2 Visualización y valoración de las señales fluorescentes observadas

El estudio de iFISH sobre secciones histológicas de TMAs nos ofrece como principal ventaja, la detección de poblaciones con distinta dotación cromosómica en los cilindros seleccionados, sin depender de la adaptación al crecimiento “*in vitro*”, como ocurre en los cultivos celulares. Por otra parte, las muestras tienen una carga nuclear mayor que en las extensiones citogenéticas: en una misma superficie tenemos mayor cantidad de núcleos para estudiar.

No obstante, esta técnica tiene el inconveniente de estar sujeta al efecto corte ⁽²⁸³⁻²⁸⁶⁾. Esta condición es intrínseca al trabajo con secciones ya que se obtiene una imagen bidimensional de una realidad tridimensional. La disposición de las células y estructuras en el tumor puede, por una parte, proporcionar imágenes de varias estructuras celulares solapadas y, por otra parte, generar confusión sobre la idoneidad de la región estudiada (figura 11). Trabajos como el de Tibiletti *et al.* ⁽²⁸⁶⁾ enfatizan la necesidad de basarse en la morfología a la hora de seleccionar la región que se estudiará por iFISH. Por este motivo es imperativo establecer los criterios de valoración que se utilizarán y ser constante en ellos, de cara a evitar variaciones procedimentales y minimizar el error experimental.

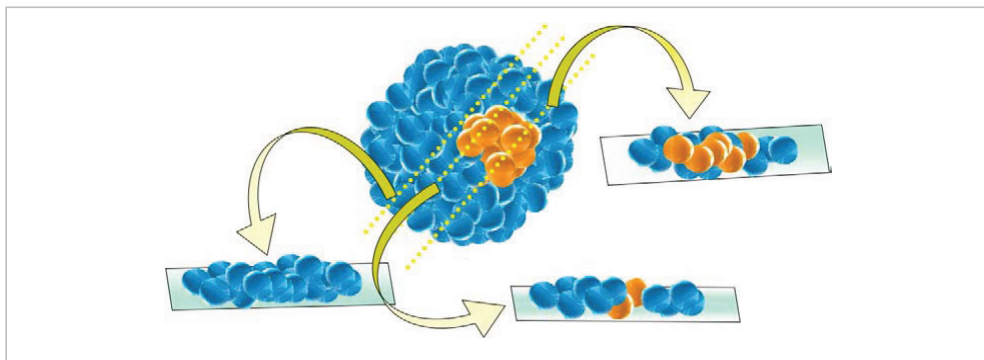


Figura 11. Consecuencias del efecto corte. Queda manifiesta la importancia de comprobar la composición en células tumorales mediante hematoxilina-eosina de una sección próxima a la que se utilizará para la técnica de iFISH ⁽²⁸⁶⁾.

Para su valoración, el conteo de las señales fluorescentes se realizó de forma ordenada con cada una de las plantillas, comenzando por la valoración en DAPI del estado de todos los cilindros incluidos en el TMA. Se anotó si algún cilindro había sido artefactuado o se había soltado de la laminilla para evitar confusiones y, a continuación, se evaluaron las señales fluorescentes en las muestras de control. Una vez aceptada la capacidad de penetración de cada sonda en el TMA, se valoraron los casos. El conteo se hizo de manera independiente por dos personas, en un microscopio de fluorescencia ZEISS Axioplan 2 (Carl Zeiss). Se contaron un mínimo de 100 núcleos por muestra aplicando los siguientes criterios:

- Para que 2 señales se consideraran independientes debían estar separadas por, al menos, el tamaño correspondiente a una señal entera.
- Cuando aparecían varios núcleos superpuestos, las señales no eran valorables.
- Se contaron las señales de cada fluorocromo en cada núcleo valorable, y se dividió por el total de núcleos no superpuestos-valorados. De manera que obtuvimos un ratio señales fluorescentes/núcleo para cada sonda.
- En los casos en que la sonda diana se hibridó simultáneamente con una sonda control (cromosomas 1 y 14), se dividió el ratio señales/núcleo de la sonda diana entre el ratio señales/núcleo de su sonda control en la misma muestra.
- En los casos en que la sonda diana no se hibridó simultáneamente con una sonda control (cromosoma 22), se estableció el ratio señales fluorescentes/núcleo en 3 muestras de tejido cerebral no tumoral, y se utilizó este ratio para la normalización respecto a las muestras problema.

2.8 Técnicas moleculares

2.8.1 Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina

Se tomaron otros 4 cilindros de 1 mm de diámetro, de 2 áreas representativas del tumor, adyacentes a las zonas que se habían seleccionado para la construcción de las micromatrices tisulares, y se introdujeron en tubos de 1,5 mL para la extracción de ADN. De esta manera se minimizó el contenido en células normales, en comparación con la

utilización de secciones completas del bloque. La extracción se realizó utilizando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). El procedimiento que se siguió comprende las siguientes etapas:

- Desparafinación: Añadir 1 mL de xileno a la muestra, agitar con vórtex vigorosamente y centrifugar. Eliminar el xileno y repetir el proceso. A continuación, añadir etanol y proceder de idéntica manera para eliminar los restos de xileno de la muestra. Incubar a 37°C durante 10-20 minutos hasta que el etanol se evapore completamente.

- Digestión química/enzimática: Añadir tampón ATL (Qiagen) y proteinasa K, mezclar bien e incubar a 56°C durante 2h. Posteriormente incubar 1h a 90°C para que el tampón ATL revierta (parcialmente) la modificación por formaldehído que sufren los ácidos nucleicos de las muestras durante la fijación e inclusión en parafina.

- Extracción del ADN de la muestra digerida: añadir una mezcla 1:1 de tampón AL y etanol y mezclar vigorosamente para que el ADN quede en solución; trasvasar el sobrenadante a una columna QIAamp MiniElute y centrifugar para que el material genético quede retenido en la membrana. A continuación, proceder a lavar con tampones comerciales (Qiagen) para eliminar las impurezas arrastradas durante el proceso de extracción. Finalmente, incubar la columna con 30 µL de agua milliQ (Millipore-Merck, Madrid, España), durante 5 minutos, 2 veces y eluir.

- Valoración de la cantidad y calidad del ADN obtenido: Medir la concentración de ADN y los cocientes 260/230 y 280/230 para valorar la eficacia del proceso y el estado de la muestra.

2.8.2 Extracción de ADN de sangre periférica

Como muestras control para las técnicas moleculares, utilizamos ADN extraído de ganglios no patológicos fijados e incluidos en parafina, que se obtuvo siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y ADN de sangre periférica de 3 donantes sanos. El protocolo de obtención de linfocitos para la extracción de ADN de sangre periférica que seguimos fue el siguiente:

- Recoger 3 mL de sangre en un tubo con EDTA. Completar hasta 7 mL con PBS.

- Poner en un tubo de fondo cónico 3 mL de LymphoPrep™ (Progen Biotechnik) y añadir lentamente la solución de sangre.
- Centrifugar 30 minutos a 2000rpm. Coger con pipeta Pasteur la interfase blanquecina y pasar a otro tubo de fondo cónico.
- Añadir 5 mL de PBS para lavar, centrifugar 5 minutos a 1000 rpm. Decantar y eliminar lo que queda de sobrenadante. El precipitado son los linfocitos.

La extracción de ADN a partir de linfocitos se realizó con el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). El protocolo seguido fue idéntico al del kit para muestras incluidas en parafina, evitando las etapas de desparafinación y digestión tisular.

2.8.3 Optimización de las muestras de ADN

Aunque la técnica de hibridación, ligación y amplificación múltiple (MLPA) ha demostrado ser una técnica robusta y reproducible ⁽²⁸⁷⁾, tanto el origen de las muestras (tipo tisular/celular) como el tratamiento al que se someten (el método de fijación, de extracción, los tampones usados para la elución, dilución o conservación, etc.) influyen en la pureza del ADN. Estas variables pueden afectar en las etapas de desnaturalización y/o amplificación, dependiendo de la sensibilidad de las sondas utilizadas a su presencia y, en consecuencia, alterar el tamaño de los picos que proporciona la técnica. Los contaminantes más frecuentes y las recomendaciones seguidas para minimizar su impacto, se describen a continuación:

- La presencia de sales puede afectar a la desnaturalización del ADN. De hecho, se desaconseja diluir las muestras 1:1 en el tampón de PCR, que contiene 1,5 mM de MgCl₂ y 50 M de KCl ⁽²⁸⁸⁾. Hay que garantizar una baja concentración, en especial cuando las regiones genómicas a analizar presenten un alto contenido en CG. La adición de EDTA es útil y ha de ser suficiente para minimizar las sales libres procedentes de la inclusión en parafina, aunque no elevada para permitir la concentración de magnesio necesaria para el funcionamiento de la polimerasa.

- Los contaminantes derivados del tejido que se co-purifican con el ADN (como los grupos hemo, heparina y melanina), y los derivados del proceso de purificación (como restos de fenol, trizol, etanol, dodecilsulfato sódico o hierro), pueden afectar a la amplificación.

Además, hay que garantizar un pH entre 8 y 9 para evitar la depurinación de las muestras durante la etapa de calentamiento inicial a 98°C. La depurinación es más acusada cuando el medio posee una fuerza iónica baja, y es frecuente en muestras que son eluidas mediante columna con agua. Las principales consecuencias de la depurinación son las siguientes:

- Si la depurinación afecta a la región diana, falla la complementariedad con la sonda y esto produce una detección de señales reducida, lo que lleva a un falso positivo para la detección.

- Si la depurinación no afecta a la región complementaria, pero sí a una zona próxima, puede desestabilizar la unión de la sonda; esto produce de igual manera, señales más bajas de lo que cabría esperar.

Con el objetivo de lograr que las muestras se encuentren en las mejores condiciones de pureza, ausencia de contaminantes, concentración y pH, que serán determinantes para la calidad de la técnica, se procedió a la precipitación de las muestras con etanol, y a su dilución en tampón Tris-EDTA con bajo contenido en EDTA: TE 10 mM Tris-HCl pH 8,2 + 0,1 mM EDTA (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). El protocolo seguido fue el siguiente:

- Completar hasta 100 µl de volumen las muestras ADN con tampón TE-Low EDTA (Fisher Scientific).
- Añadir 2,5 µl de Glicógeno (Invitrogen, Life Technologies, Glasgow, Escocia) como ayudante para proporcionar viscosidad al ADN y favorecer su precipitación. Resuspender con pipeta.
- Añadir 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M (Sigma-Aldrich) a pH 5,2 y resuspender con pipeta.
- Añadir 2,5-3 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión varias veces. Precipitar por gravedad, durante 2-4h a -80°C o toda la noche a 4°C.
- Centrifugar 10 minutos a 14000g/12°C. Decantar, sin perder de vista el sedimento.
- Lavar el pellet añadiendo 250 µl de etanol al 70% frío.
- Centrifugar 10 minutos a 10000g/12°C.
- Decantar, eliminar los restos de etanol.
- Resuspender el pellet con tampón TE-Low EDTA, de 20 µl hasta unos 200 µl.

Cuantificamos la muestra con Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EEUU) para conocer la concentración y las ratios A260/280 (>1.6-2.0), A260/230 (>1.5) y el valor A340 (<0.2).

2.8.4 Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (MLPA)

La MLPA es una técnica molecular que se utiliza para determinar la variación en el número de copias de hasta 50 secuencias de ADN, simultáneamente, en una muestra. Se basa en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada reacción de MLPA produce una combinación de amplicones (fragmentos de amplificación por PCR) con una longitud en nucleótidos que varía entre 64 y 500. Estos amplicones pueden ser separados por electroforesis capilar, identificados, y cuantificados con los softwares accesorios adecuados (figura 12). La MLPA se desarrolla en 4 fases:

- **Desnaturalización** (Día 1): Poner 5 µL de ADN (50-250 ng) en cada tubo. En el termociclador, programar 5 minutos a 98°C y enfriar hasta 25°C. Sacar los tubos.
- **Hibridación** (Día 1): Preparar una mezcla con 1,5 µL de tampón de MLPA y 1,5 µL de la mezcla de sondas que vamos a utilizar, por cada muestra. Añadirla a cada tubo con los 5 µL de ADN muestra. Incubar 1 minuto a 95°C y a continuación 16-20h a 60°C.
- **Ligación** (Día 2). Preparar una mezcla con 25 µL de H₂O, 3 µL de tampón de ligación A, 3 µL de tampón de ligación B y 1 µL de enzima Ligasa-65. Detener el termociclador a 54°C y añadir la mezcla a las muestras. Incubar 15 minutos a 54°C seguido de 5 minutos a 98°C y bajar a 20°C.
- **PCR** (Día 2). Preparar una mezcla con 7,5 µL de H₂O, 2 µL de SALSA PCR primer mix y 0,5 µL de polimerasa SALSA, y añadirlo a las muestras.

El programa del termociclador es:

35 ciclos	30 segundos a 95°C
	30 segundos a 60°C
	60 segundos a 72°C
1 ciclo	20 minutos a 72°C
Fin	15°C

El producto de la PCR multiplex ha de ser separado mediante electroforesis capilar, con la cual obtendremos el perfil de picos que nos indicará si el procedimiento ha concluido con éxito. La MLPA es una técnica relativa, por lo que en todos los experimentos deben ensayarse simultáneamente muestras control; se detectarán diferencias con respecto a estos controles, por lo que su elección y adecuada conservación será determinante para el éxito de la técnica. Deben incluirse 3 muestras control por cada 20 muestras.

Los kits de sondas SALSA MLPA contienen, además de las sondas de las regiones de interés, 2 sondas para los cromosomas sexuales y 3 sondas que producirán 3 fragmentos de control de la desnaturalización, llamados "fragmentos D"; se identifican a 88, 92 y 96 nucleótidos. Dependen del ADN y de la eficacia de la ligación, igual que las sondas normales de MLPA. Su tamaño debe ser visible cuando la ligación ha funcionado correctamente la desnaturalización ha sido satisfactoria y la cantidad de ADN suficiente.

Las regiones que se detectan a 88 y 96nt tienen un elevado porcentaje de nucleótidos CG, lo que dificulta su desnaturalización; si el tamaño de los picos es menor al 40% del pico a 92nt, la desnaturalización de la muestra no habrá sido completa y no habrá garantía de que los resultados sean reproducibles. No obstante, lo más frecuente es que la desnaturalización incompleta afecte únicamente a las sondas localizadas en los exones 1 de los genes, ya que son esas las que suelen tener un mayor contenido en nucleótidos GC.

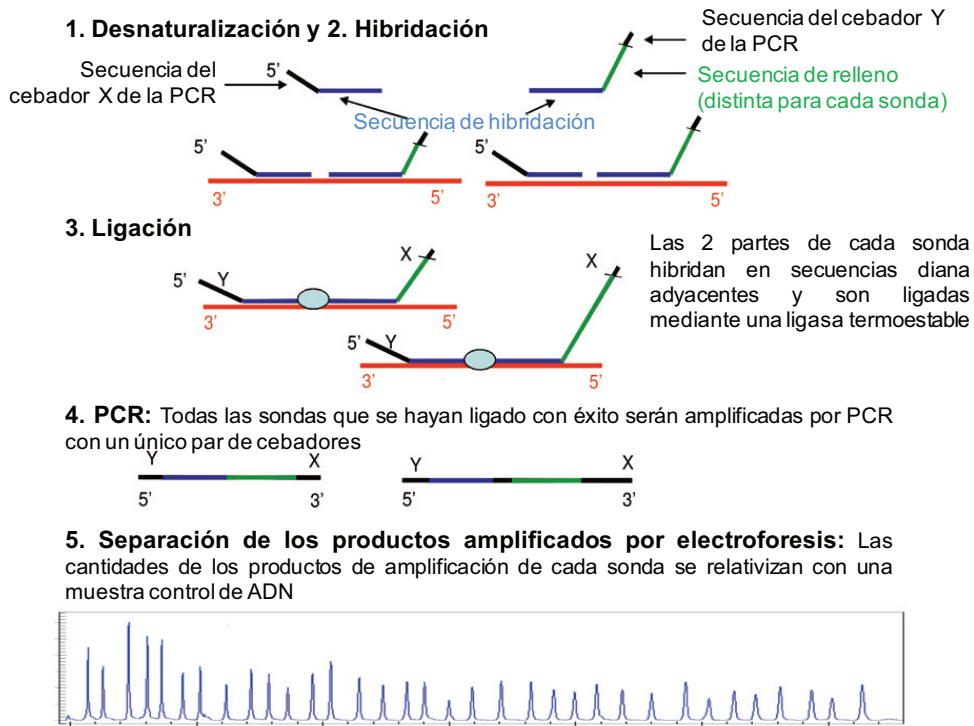


Figura 12. Esquema del protocolo seguido para la técnica MLPA. Se reflejan las 4 etapas básicas: desnaturalización, hibridación, ligación y PCR, que culmina con el análisis de fragmentos por electroforesis capilar. Modificado de www.mlpa.com.

El kit utilizado para esta técnica fue SALSA MLPA P044-NF2 (MRC-Holland, Amsterdam), que incluye sondas para estudiar los 17 exones que forman el gen *NF2*; en la proteína merlín encontramos que los exones 2 a 8 codifican la región homóloga a las proteínas tipo 4.1, el exón 9 codifica un dominio de unión y los exones 10 a 15 codifican la región en α -hélice de la proteína y los exones 16 y 17, el dominio C-terminal. Por otra parte, este kit incluye sondas para otras 9 regiones genómicas localizadas en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 8, 14, 15, 16. Las parejas de cebadores que forman las sondas que se amplifican en esta MLPA, así como el *locus* cromosómico, se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Genes y cebadores incluidos en el kit de MLPA P044-B1 NF2

Gen	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso
UROD	01p34.1	CTGGCCCAAGCTGGCTATGAG GTG	GTTGGGCTTGACTGGACAGTGGCCCAA
IL1RN	02q13	GGCAGTTAACATCACTGACCT GAG	CGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTC GCC
SCN5A	03p22.2	CGGGTGAAGAAAGACCCAAAG ATGATGAAA	ATGACAAAATAGATGTACATGTAGAGTT GTATCCCCTGAGGCTGCT
IL2	04q27	CCTCAACTCCTGCCACAATGTA CAGG	ATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAG TCTTGCCT
KLKB1	04q35.2	CTTCCATGTACACCCCAATGC CCAATACT	GCCAGATGAGGTGCACATTCCACCCAAG GTGTTTGCTATTGAG
SEMA5A	05p15.2	GTGTTGGTGTGTGAGACTTGG GCTGGA	GTGCCCACGTGGCTGTGGAGTCAGTGT GATTCATGATTGA
IL4	05q31.1	CTACATTGTCACTGCAAATCGA CACCTAT	TAATGGGTCTCACCTCCCAACTGCTTCC CCCT
PTK2	08q24.3	CCAGGTTTCTGGCTACCCTGG TTCACATG	GAATCACAGCCATGGCTGGCAGCATCTA TCCAGGTCAGGCA
NFKB1A	14q13.2	TCAGGAGCCCTGTAATGGCCG	GACTGCCCTTCACTCGCAGTGGACCTG CAA
FBN1	15q21.1	CAGTCTCCTTTGTGACAATGGA CAATGTAG	AAATACTCCTGGAAGTTTTGTCTGTACCT GCCCCAAGGGA
FANCA	16q24.3	CTGTTTCAGATGCAGAGAGAGT GGAGCT	TTGCGCGGACACACCCTCTGCTCACCTC ACTGTACCGCAG
NF2 Exon 1	22q12.2	GTGTCCGAAACGCAGTCCCCT	GGGGCGCCACACTCGGAGCCTACTTGA ACCGAAGAGTCCCCTCC
NF2 Exon 2	22q12.2	TCCGCATGAGCTTCACTCTCT CAA	GAGGAAGCAACCCAAGACGTTACCGTG AGGATCGTC
NF2 Exon 3	22q12.2	GGGCTCCGAGAAACCTGGTTC TT	TGGACTGCAGTACACAATCAAGGACACA GTGGCCTGGC
NF2 Exon 4	22q12.2	GGCCAAATTTTATCCTGAGAAT GCTG	AAGAGGAGCTGGTTCAGGAGATCACACA ACATTTATTCTTCTTACAG
NF2 Exon 5	22q12.2	CCGATCTACTGCCCTCCTGAG GCT	TCTGTGCTCCTGGTTCCTACGCCGTCC AGGCCAAGG
NF2 Exon 6	22q12.2	CGGTGACTACGACCCAGTGT TC	ACAAGCGGGGATTTTTGGCCCAAGAGGA ATTGCTTCCA
NF2 Exon 7	22q12.2	CRACTCCGAAATGTGGGAGG AGA	GAATTACTGCTTGGTACGCAGAGCACCG AGGCCGAGCCAG
NF2 Exon 8	22q12.2	GGGATGAAGCTGAAATGGAAT ATCTGAAG	ATAGCTCAGGACCTGGAGATGTACGGTG TGAATACTTTGCAATCCG
NF2 Exon 9	22q12.2	GTGGATGCCCTGGGGCTTCAC AT	TTATGACCCTGAGAACAGACTGACCCCC AAGATCTCCTTCCCCT
NF2 Exon 10	22q12.2	CCAGTGTGGTTGCGCATTGT	GGAATTTCCAATTGCTGGTAACTTCCAG GCTGTCCGACTGAAACT
NF2 Exon 11	22q12.2	CAAGTTGTGCTCACCTGCTTT CT	AGCCTTCTCCTCCCTGGCCTGGGCTTTC ATCTGCTGAACT
NF2 Exon 12	22q12.2	CTCAGAAATCACCAGTGCTTC GTTGGCCATTG	TTGCTTCTTCTTTCATCTGCAGCAGCCTC CTCTCCAACCTCA
NF2 Exon 13	22q12.2	GGCCAGATCACCGAGGAGGA	GGCAAACTTCTGGCCAGAAAGGCCGCA GAGGCTGAGCAGGAAATG

Gen	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso
NF2 Exon 14	22q12.2	GGCAGATCAGCTGAAGCAGGA	CCTGCAGGAAGCACGCGAGGCGGAGCG AAGAGCCAAGCAG
NF2 Exon 15	22q12.2	CCTCCTGACATACCAAGCTTCA ACCTCAT	TGGTGACAGCCTGTCTTTTCGACTTCAA GATACTGACATGAAGCGGC
NF2 Exon 16	22q12.2	GCAGGAGCAGCTCAATGAACT CAA	GACAGAAATCGAGGCCTTGAAACTGAAA GAGAGGGAGACAGCTCTG
NF2 Exon 17	22q12.2	GGGCACTTTGGAGACTGGTGT GTTTA	ACTCAAGATCAAGACCTTTTATGCGTTGA CAGCCTCTCAAGACC

Regiones estudiadas con el kit SALSA MLPA P044-NF2 (MRC-Holland): Genes introducidos en el análisis incluyendo los 17 exones del gen NF2, localización cromosómica de las secuencias estudiadas y cebadores empleados en la PCR múltiple.

2.8.5 Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación, específica para secuencias metiladas (MS-MLPA)

La MS-MLPA es una adaptación de la técnica MLPA, que sirve para determinar simultáneamente la variación en el número de copias (VNC) y el estado de metilación de las regiones estudiadas, mediante una PCR múltiple. El fundamento de la técnica es similar al de la MLPA, pero tras la hibridación se dividió cada muestra en dos tubos distintos para las dos determinaciones que haremos: en uno de ellos, el proceso será el descrito anteriormente para el estudio de VNC; el segundo tubo será sometido a una digestión con el enzima de restricción sensible a metilación Hha1 (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) que actuará a la vez que la ligasa y de este tubo obtendremos la información relativa al estado de metilación. Las sondas que se utilizan en la MS-MLPA se han diseñado de manera que reconocen secuencias que contienen sitios de restricción para esta enzima Hha1. Cuando una muestra no metilada se somete a estos procesos, en el tubo en que se ha hecho la digestión enzimática no podrá haber amplificación y, por tanto, no se obtendrá pico al realizar la electroforesis capilar. Por otro parte, si la muestra sí que está metilada, el enzima no podrá digerirlo y sí que se producirá amplificación, por lo que se detectará el correspondiente pico en la electroforesis. Como simultáneamente se ensaya la misma muestra sometida y no sometida a digestión enzimática, la técnica permitirá comparar el patrón de picos de dicha muestra con y sin digestión, de manera que es posible identificar qué regiones no están metiladas y cuáles sí lo están.

El esquema de la reacción es muy similar, aunque cambia la temperatura de ligación, para que sea adecuada también a la digestión con Hha1 (figura 13):

- Desnaturalización del ADN: 98°C, 5 minutos; 25°C y pausar.
- Hibridación: 95°C, 1 minuto; 60°C, 16h; 20°C y pausar.
- Separación en 2 tubos y adición de las mezclas de ligación al primero y ligación+digestión al segundo.
- Ligación y ligación/digestión: 48°C durante la adición, 48°C, 30 minutos; 98°C, 5 minutos y pausar a 20°C.
- PCR: 35 ciclos a 95°C, 30s; 60°C, 30s; 72°C, 60s. Elongación final a 72°C, 20 minutos y detención a 15°C.

La técnica de amplificación múltiple de sondas específicamente metiladas, dependiente de ligación fue la elegida para el estudio simultáneo de la VNC y del estado de metilación de un conjunto de genes supresores tumorales que incluía genes involucrados en las vías de reparación (*MLH1*), control del ciclo celular (*CDKN2A*, *CDKN2B*), proliferación y apoptosis (*TP73*, *CASP8*, *RASSF1*, *CASR*, *APC*), entre otros. Para ello, el kit seleccionado fue el SALSA MS-MLPA KIT ME001-C2 Tumour suppressor-1, que incluye 41 sondas que hibridan y amplifican 38 genes diferentes: 24 genes supresores de tumor, para los que proporciona información en cuanto al número de copias y al estado de metilación ya que sus sondas son sensibles a la digestión por HhaI, y 14 genes adicionales implicados en la biología de los tumores sólidos humanos (tabla 6).

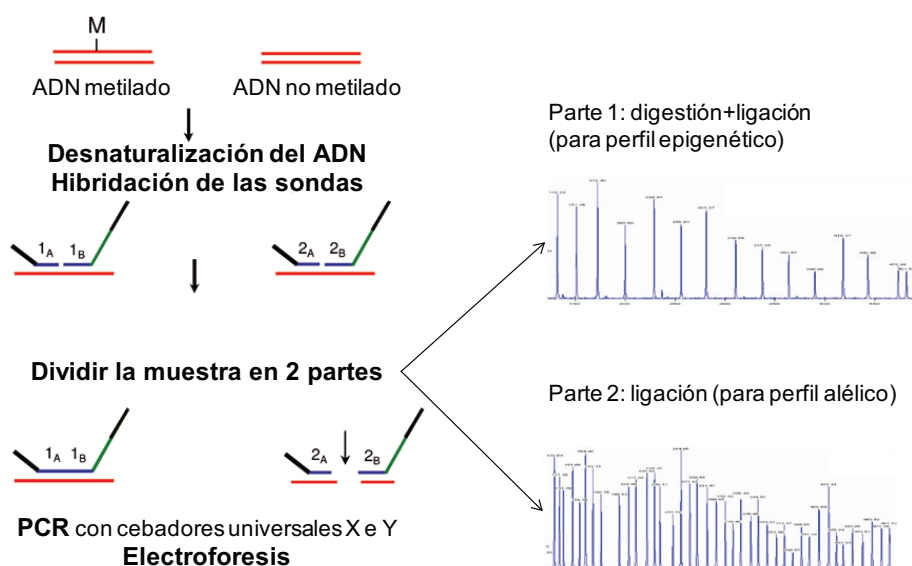


Figura 13. Esquema resumen de la técnica MS-MLPA. Refleja en paralelo el comportamiento de una muestra digerida con HhaI en caso de estar metilada o en caso de no estarlo. Modificado de www.mlpa.com.

Tabla 6. Genes y cebadores incluidos en el kit de MLPA ME001-C2 Tumor Suppressor Genes

Gen	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso
<i>TP73*</i>	01p36.32	CGCCCGCAAGGGGACGCAGC	GAAACCGGGGCCCGCCAGGCCAG CCGGGA
<i>CASP8*</i>	02q33.1	CTTTCCAATAAAGCATGTCCAGCGCT C	GGGCTTTAGTTTGCACGTCCATGAATT GTCTGCCACA
<i>VHL*</i>	03p25.3	GCGAAGACTACGGAGGTCGACTCGG G	AGCGCGCACGCAGCTCCGCCCGCG TCCGACC
<i>RARB*</i>	03p24.2	CCGCCGGCTTGTGCGCTCGCT	GCCTGCCTCTCTGGCTGTCTGCTTTTG CAGGGCTGCT
<i>MLH1*</i>	03p22.2	CGTTGAGCATCTAGACGTTTCCTTGG CTCT	TCTGGCGCCAAAATGTCGTTCTGCGC AGGGGTTATTC
<i>MLH1*</i>	03p22.2	CTGCTGAGGTGATCTGGCGCAGA	GCGGAGGAGGTGCTTGGCGCTTCTCA GGCTCCTCCTCT
<i>RASSF1*</i>	03p21.31	CAGTCCCTGCACCCAGGTTTCCA	TTGCGCGGCTCTCCTCAGCTCCTTCC CGCCGC
<i>RASSF1*</i>	03p21.31	GTCCACAGGGCGGGCCCCGAC	TTCAGCGCTCCCCAGGATCCAGAC TG
<i>FHIT*</i>	03p14.2	CGCGGGTCTGGGTTTCCACGC	GCGTCAGGTCATCACCCCGAGCCCCA GTGGG
<i>APC*</i>	05q22.2	CTCAGCTGTGTAATCCGCTGGATGCG GACC	AGGGCGCTCCCCATTCCCGTCCGGGAG CCCCG

Gen	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso
ESR1*	06q25.1	CGCCCGCCGTGTACAACCTACCCCG	AGGGCGCCGCCTACGAGTTCAACGCC GCGGC
CDKN2A*	09p21.3	CAGAGGGGAAGAGGAAAGAGGAAGA AGCGCTCAGAT	GCTCCGCGGCTGTCGTGAAGTTAAA ACCGAAAATAAAAATGG
CDKN2B*	09p21.3	CTGCGACAGCTCCTGGAAGCCGG	CGCGGATCCCAACGGAGTCAACCGTT TCGGGAGG
DAPK1*	09q21.33	CGCGAGGATCTGGAGCGAACTGCT	GCGCCTCGGTGGGCCGCTCCCTTCCC TCCCT
PTEN*	10q23.31	CACCGGAGCGGGCGCAGGAGA	GGCCTGCGGGGTGCGTCCCCTCACA GGGAT
CD44*	11p13	CTCCTTTGCGCCGCGCCCTCC	GTTTCGCTCCGGACACCATGGACAAGT TTTGGTGG
GSTP1*	11q13.2	CGAAGAGCGGCCGCGCCGTG	ACTCAGCACTGGGGCGGAGCGGGGC GGGACC
ATM*	11q22.3	GGAGGGAGGAGGCGAGAGGAGTCCG GGA	TCTGCGCTGCAGCCACCGCCGCGT GATACTACTTT
IGSF4*A	11q23.3	CCTGGAGCCCGAGTCCTTGACGCCC A	GGCGCCCGGAGAACACTTTTTCTT GATCCGGGGAAAGCA
CDKN1B*	12p13.1	CAGCCCCTGCGCGCTCCTAGA	GCTCGGGCCGTGGCTCGTGGGGTC TGTGTCTTT
CHFR*	12q24.33	CGCGAGAGTAGGCGCGTGGAGG	GCGCTCGGCCATCTTTGATCCTGACC AGGCGACTTCGT
BRCA2	13q13.1	GGCCATGGAATCTGCTGAACAAAA	GGAACAAGTTTATCAAGGGATGTCA CAACCGTGTGGAAGTTGCGT
BRCA2*	13q13.1	CGGGAGAAGCGTGAGGGGACAGATT TGTG	ACCGGCGCGTTTTTTGTCAGTTACTC CGGCCAAAAAAGA
CDH13*	16q23.3	GTTCTGTGCGTTCTCCTGTCCCAG	GTAGGGAAGAGGGGCTGCCGGGCGC GCTCTG
HIC1*	17p13.3	CCGCTCCAGATAAGAGTGTGCGGA	AAGCGCGGCGGGGCTGAGACGCGAC CAGGAC
BRCA1*	17q21.31	GTTCTCAGATAACTGGGCCCTGC	GCTCAGGAGGCCTTACCCTCTGCTC TGGGTAAAGGT
TIMP3*	22q12.3	TCCAGCGCCGAGGCAGCCTCGC	TGCGCCCCATCCCCTCCCGCGGGCA CTCGG
CTNNB1	03p22.1	GGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACA	GTCTTACTGGACTCTGGAATCCATTC TGGTGCCACT
CASR	03q21.1	CCAGTGCCGTGAACAAGTGCCAGAT GACT	TCTGGTCCAATGAGAACCACACCTCCT GCATTGCCAAGGA
PARK2	06q26	CGTTCACGACCCTCAACTTGGCTACT	CCCTGCCTTGTGTGGTAAGTCTAGC ATGTTTTCTCTCCAT
CDK6	07q21.2	GCGTGATTGGACTCCCAGGAGAAGAA GACT	GGCCTAGAGATGTTGCCCTTCCCAGG CAGGCTTTTCA
CREM	10p12.1	GCTCCTCCACCAGGTGCTACAAT	TGTACAGTACGCAGCACAATCAGCTG ATGGCACACAGCAGT
CELF2	10p14	CAATTGCCATTTTTCTGACATTCAC TGT	GGAATTTGGTGCACGACACTGTTAG GGGAGATCTGT
TNFRSF1 A	12p13.31	TGCCACACTGCCCTGAGCCCAA	ATGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTGT CTGGC

Gen	Posición	Cebador Directo	Cebador Reverso
CD27	12p13.31	GAAAGTCCTGTGGAGCCTGCA	GAGCCTTGTGTTACAGCTGCCCCAG GGAGG
PAH	12q23.2	CAGTGCCCTGGTTCCCAAGAA	CCATTCAAGAGCTGGACAGATTTGCCA ATCAGATTCTCAG
MLH3	14q24.3	GCGACCTTGTCTTCTTTCTTCCGA	GAGCTCGAGCAGAGAGGACTGTGATG AGACAGGATAACAG
TSC2	16p13.3	GAGCCAGAGAGAGGCTCTGAGAAGA AG	ACCAGCGGCCCTTTCTCTCCCAC AGGGCCTCCTG
CDH1	16q22.1	CTATGAAGGAAGCGGTTCCGAAGCTG CTA	GTCTGAGCTCCCTGAACTCCTCAGAG TCAGACAAAGACCAGGAC
BCL2	18q21.33	CTTCTCCTGGCTGTCTCTGAAGACTC	TGCTCAGTTTGGCCCTGGTGGGAGCT TGCATC
KLK3	19q13.33	TGTGTCACCATGTGGGTCCCG	GTTGTCTTCTCACCTGTCCGTGACG TGGGA

Genes estudiados con el kit ME001-C2 (MRC Holland), regiones cromosómicas en que se ubican y secuencias de los cebadores utilizados. Los asteriscos indican los genes supresores de tumor que disponen de secuencias de restricción para HhaI y por tanto son aptos para el análisis simultáneo de VNC y estado de metilación.

2.8.6 Evaluación y valoración de los picos obtenidos: software Coffalyser®

Existen diferentes métodos de análisis con el *software* Coffalyser, si bien los pasos iniciales son comunes a todos ellos y consisten en una primera evaluación del producto obtenido por amplificación con MLPA (figura 14). La elección del método de análisis más adecuado depende del kit de MLPA utilizado, del tipo de muestra analizado y de la cantidad de alteraciones que se espera detectar:

- **“Tumor analysis (LS)”**: Normaliza los datos frente a las sondas de referencia y se aplica en kits que contienen sondas de referencia pero, o bien el número de referencias es bajo, o se espera que alguna de ellas contenga aberraciones. El sistema es robusto siempre que más del 51% de las regiones diana de las sondas de referencia estén intactas. Este es el sistema seleccionado para el estudio del gen *NF2*, ya que entre las regiones de referencia se encuentran los *loci* 1p34 o 14q13, que están alterados en los meningiomas, si bien su proporción no alcanza el 51%.

Para la interpretación de los resultados, nos hemos basado en el protocolo estándar que establece como delección en heterocigosis los valores entre 0.7-0.3 y delección en homocigosis a los valores menores a 0.3. Para determinar el estado de los principales

dominios de *NF2* se calculó la media de los exones que comprenden los dominios básicos del gen: exones 2-8, exón 9 y exones 10-15, y exones 2-17 para evaluar el gen completo.

- **“Population analysis (LS)”**: Es el método recomendado cuando el número de cambios que se espera en las regiones de interés es menor al 40%, de manera que permite ensayar, en igualdad de condiciones, todas las regiones génicas incluidas en el kit, sin necesidad de asignar rol de referencia/diana. Es el análisis seleccionado para el estudio de genes supresores de tumor, ya que las regiones predefinidas como referencia, en las neoplasias pueden hallarse alteradas. En el estudio de un tumor como es el meningioma, en el que son frecuentes las pérdidas alélicas en numerosos *loci* cromosómicos, es necesario evitar caer en la asunción de normalidad de regiones que podrían no serlo. Sin embargo, aunque son muy diversas las regiones que presentan alteraciones en el meningioma, su incidencia suele ser baja, por lo que no se espera en ninguna de ellas sobrepasar los límites indicados.

De cara a reducir los posibles falsos positivos derivados de los artefactos que pueda producir el material fijado e incluido en parafina, se rebajó el límite para la consideración de la delección; así, basándonos en publicaciones previas establecimos los siguientes límites:

- $X > 2$ Ganancias alélicas
- $0,3 \leq X \leq 0,65$ Delecciones en heterocigosis
- $X \leq 0,3$ Delecciones en homocigosis

- **“Direct Methylation Status (P)”**: Es el método para evaluar el grado de metilación de los genes de interés. Compara los picos obtenidos en las muestras normales frente a su pareja sometida a digestión enzimática con HhaI. Las regiones no metiladas son sensibles al enzima de restricción por lo que no se producirá amplicón y no se detectará pico, mientras que las regiones metiladas será resistentes a la digestión enzimática y se producirá amplificación. El cociente entre el pico sometido a digestión y el normal, proporciona el grado de metilación de la región, expresado en porcentaje. Se consideró que había hipermetilación cuando el valor de este cociente era superior al 20% ⁽²⁶²⁾.

FILTERED DATA	RUN NAME	IDNA	N° P	N° C. P	LG_OK?	M/F	DD_OK? (88)	DD_OK? (96)
	8362.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
	8798.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
New project 05-07-2014 205745 f	8800.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
	8801.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
All runs QC	8804.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
Reference runs QC	8805.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
Sample runs QC	8806.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
	8807.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
	8810.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
New project 05-07-2014 205745 f	8811.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
	8818.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
Reference runs	8822.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
Sample runs	8831.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
	8833.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK
	8880.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
	8884.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
	8886.ME001C1.U.116.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Female	OK	OK
	8952.ME001C1.U.110.fsa*GMsTXT.txt	OK	41	15	YES	Male	OK	OK

Figura 14. Visor de Coffalyser. Muestra los casos introducidos en un experimento y la valoración inicial de la calidad de la MLPA.

2.9 Análisis estadístico

Para valorar el grado de asociación entre las diferentes variables que hemos estudiado, utilizamos el *software* SPSS-PASW Statistics (IBM, Madrid, España). Las variables cuantitativas continuas en que era posible, fueron categorizadas para este análisis estadístico; tal fue el caso del índice Ki-67, los valores de MLPA de VNC y del estado de metilación. Los análisis desarrollados, en función de las variables analizadas, fueron los siguientes:

- **Comparaciones entre una variable categórica y una variable cuantitativa continua:** se evaluaron las condiciones de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (prueba de Levene) (figura 15A).

1) Si se cumplían las 2 condiciones, los estadísticos utilizados fueron el test T-student cuando la variable categórica tenía 2 valores o ANOVA cuando la variable categórica tenía más de 2 valores.

2) Si no se cumplían las 2 condiciones se recurría a estadísticos no paramétricos: cuando la variable categórica tenía 2 categorías, se valoró el estadístico U de Mann-Whitney. Cuando la variable categórica tenía más de 2 categorías, la H de Kruskal-Wallis.

- **Comparaciones entre variables categóricas:** mediante tablas de contingencia se utilizó el Chi-cuadrado de Pearson. En los casos en que alguna casilla tenía una frecuencia esperada menor a 5, se utilizó el estadístico exacto de Fisher. En los casos en que la tabla de contingencia era mayor a 2x2 se utilizó la V de Cramer. En los casos en

que había un grupo con 1-2 casos frente a 0, no se aceptaron los valores que salían significativos (figura 15B).

- **Curvas de supervivencia:** Se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier para relacionar el tiempo en meses hasta la aparición de recidiva tumoral, con el análisis de VNC de cada gen y el estado de metilación.

- **Coefficiente Kappa de Cohen:** se utilizó para determinar la fuerza del acuerdo entre diferentes técnicas que realizaban una observación similar; es el caso del estado del cromosoma 22/NF2 estudiado mediante técnicas citogenéticas y mediante técnicas moleculares.

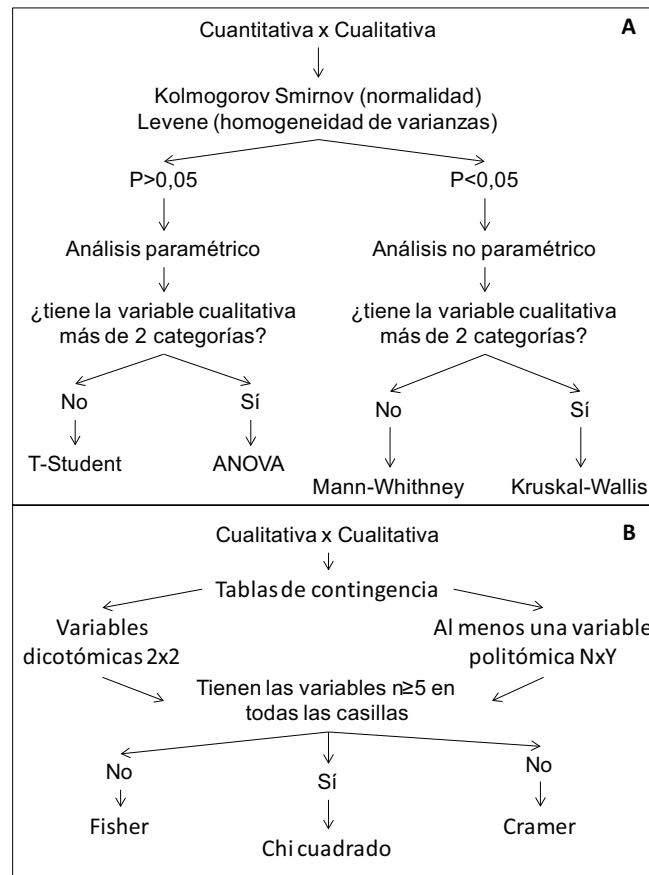


Figura 15. Diagrama de decisiones para el análisis estadístico básico. A: Método de análisis utilizado en las variables cualitativas. B: Método de análisis utilizado cuando al menos una de las variables era cuantitativa continua.

RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos en 120 muestras tumorales procedentes de 101 pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Neurocirugía del Hospital Clínico Universitario de Valencia y diagnosticados como meningiomas en el Servicio de Anatomía Patológica de este hospital.

1 Características clínicas

La información clínica relativa a los 101 pacientes se recoge en la tabla 7. En ella se resumen los parámetros de sexo, edad, localización, diámetro mayor, síntoma de debut de la enfermedad, subtipo histológico de meningioma, grado histopatológico según los criterios de la OMS y recidiva cuando la hubo.

Edad y sexo: De los 101 pacientes, 71 fueron mujeres y 30 fueron hombres, lo que representa un ratio de 2,3:1. En conjunto presentaron una edad media de $58,1 \pm 13,4$ años, con una edad máxima de 88 y una mínima de 7 años. La mediana se situó en 60 años. La media de edad de las mujeres fue de $58,1 \pm 10,9$ años, con una máxima de 83 años y una edad mínima de 34, mientras que en los hombres la media fue de $54,8 \pm 17,8$ años, con un máximo de 88 y un mínimo de 7. Hubo un único meningioma “en edad pediátrica” (7 años de edad), 6 casos de pacientes por debajo de los 40 años, 17 de 40-50 años, 23 de 50-60 años, 34 de 60-70 y 20 casos en pacientes por encima de los 70 años de edad. (figura 16)

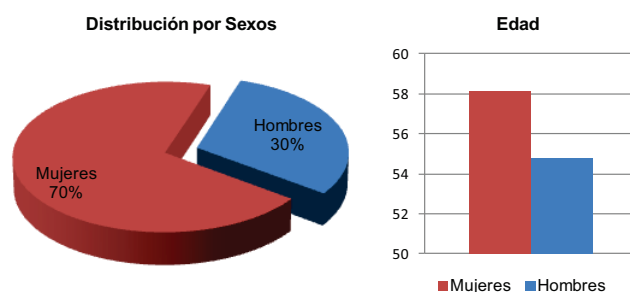


Figura 16. Distribución de los tumores estudiados en función del sexo de los pacientes y en función de la edad media de los mismos, en cada sexo.

Localización: 95 de los 101 pacientes incluidos en el estudio presentaron meningiomas que se situaban en la región encefálica (94,1%); el resto, un total de 6 casos, se localizaron en la región espinal (5,9%). Las localizaciones concretas de los 95 tumores encefálicos se detallan a continuación:

- **Tumores supratentoriales: 63**

- Convexidad del cerebro: 47 (figura 17A)

- Frontales: 21

- Parietales: 9

- Occipitales: 6

- Temporales: 2

- Fronto-parietales: 3

- Parieto-temporales: 6

- Regiones parasagitales izquierda y derecha: 13

- Tumores intraventriculares: 3

- **Tumores de la base del cráneo: 21 (figura 17B)**

- Esfenoidales: 11

- Surco olfatorio: 6

- Silla turca (intrasellar, parasellar etc.): 3

- Área petroclicival: 1

- **Tumores de la fosa posterior: 11 tumores (figura 17B)**

- Tentorio: 2

- Ángulo pontocerebeloso: 9

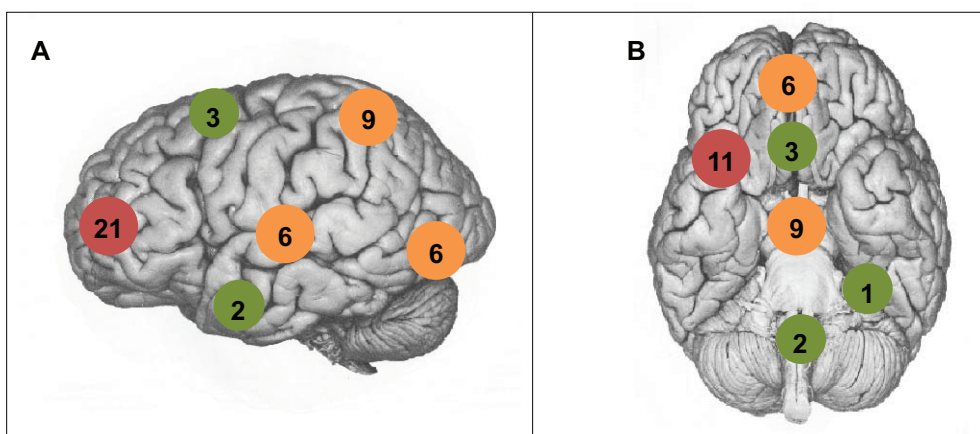


Figura 17. Localización cerebral de los meningiomas estudiados. A: tumores localizados en la convexidad: 21 tumores frontales, 9 parietales, 6 occipitales, 3 frontoparietales, 2 temporales y 6 temporoparietales. B: tumores situados en la base del cráneo y en la fosa posterior: 11 tumores esfenoidales, 9 tumores del ángulo pontocerebeloso, 6 tumores en el surco olfatorio, 3 en la silla turca, 2 tentoriales y 1 petroclicival. No se representan los tumores parasagitales (n=13), intraventriculares (n=3) y espinales (n=6). Modificación de www.anatomyatlases.org.

Tamaño: El diagnóstico radiológico mostró tumores cuyo diámetro mayor osciló entre 1 y 10 cm; de media el diámetro mayor fue de $4,3\pm 1,9$ cm y la mediana de 4 cm. Los tumores de la base del cráneo fueron los mayores (5,1 cm), seguidos de los supratentoriales (4,5 cm) y los de la fosa posterior (3,9 cm).

Los tumores espinales, con un tamaño medio de 2cm fueron significativamente más pequeños que el resto ($p=0,04$). El tamaño también mostró diferencias entre los sexos: los hombres presentaron masas con una media de $5,1\pm 2,2$ cm y las mujeres de $4,0\pm 1,7$ cm ($p=0,002$).

Síntoma inicial: La sintomatología que guió la sospecha diagnóstica fue de origen diverso: la cefalea de larga duración o intensidad, como síntoma único, se dio en 18 casos (17,8%), en 8 casos, fue acompañada de desorientación temporo-espacial (7,9%) y en otros 7 se asoció con hipertensión endocraneal (6,9%).

Un total de 26 pacientes debutaron con déficits de tipo sensorial (25,7%), como la pérdida del oído o la alteración del olfato o el gusto y, con particular presencia, mostraron afectación de la capacidad visual (50,0% de ellos). Ocho pacientes debutaron con síntomas de deficiencia neurológica (7,9%), tales como falta de sensibilidad, alteraciones en la memoria, afasia o problemas de coordinación. Catorce pacientes presentaron déficits motores, tipo parkinsonismo o pérdida de movilidad de extremidades (13,9%) y otros 13 presentaron crisis comiciales, ataques epilépticos tónico-clónicos o crisis de ausencia (12,9%). Por último, 7 tumores se detectaron por hallazgo casual, como consecuencia del control de otra neoplasia y/o ingresos en urgencias por otras causas que conllevaron exploración radiológica.

Cirugía: Siguiendo la escala de Simpson, la extirpación de los tumores se estratificó según la radicalidad como exéresis completa (grados I y II de Simpson) y exéresis subtotal (grados superiores) ⁽³¹⁻³³⁾. Así pues, la resección fue completa en 90 casos (89,1%) y subtotal en 11 casos (10,1%).

Evolución: De los 101 pacientes cuyos tumores analizamos, tras un seguimiento mínimo de 5 años, 51 se encuentran libres de enfermedad, 43 pacientes sufrieron

recidivas tumorales y en 7 casos no se pudo establecer la evolución por *exitus* del paciente, como consecuencia de complicaciones durante la cirugía o por muerte natural en un periodo de tiempo inferior a 18 meses.

En los 51 pacientes que no sufrieron recidivas tumorales, el período de vida libre de enfermedad medio fue de 7 años y 5 meses, con un seguimiento máximo de 19 años y 9 meses y mínimo de 5 años hasta el alta definitiva, a excepción de 3 casos en que el alta se dio a los 19, 20 y 24 meses respectivamente, y que no han sufrido reingresos posteriores.

En los 43 pacientes que sufrieron recidivas tumorales, el tiempo medio hasta la primera recidiva fue de 5 años y 2 meses, con una desviación estándar de 3,1 años. El período máximo hasta la primera recidiva fue de 142 meses (11 años y 11 meses) en el caso nº 20 y el mínimo fue de 9 meses en el caso nº 25. En conjunto, un 32,9% de los casos sufrió recidivas en un periodo inferior a 5 años; un 40,4%, si consideramos 10 años de control y el 44,7% de los pacientes sufrieron recidivas cuando el período de control se prolongó más de 10 años (figura 18).

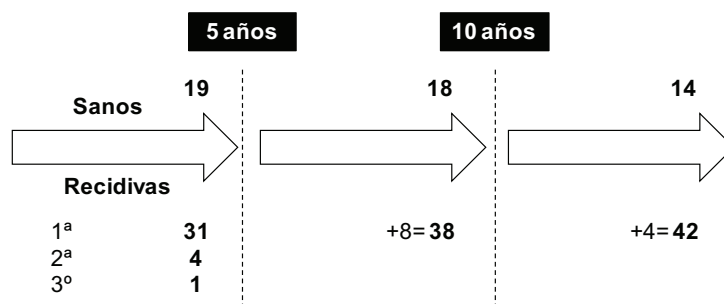


Figura 18. De los 94 pacientes en que hemos podido establecer la evolución, 31 sufrieron la primera recidiva en un periodo inferior a 5 años, 8 la sufrieron en un periodo de 10 años y 4 más después de 10 años tras el diagnóstico inicial. En todos los casos con más de una recidiva tumoral, tanto la primera recidiva como las siguientes se produjeron en un periodo inferior a 5 años.

Tabla 7. Características clínicas e histopatológicas

Caso	Muestra	Sexo	Edad	Localización	Diámetro	Síntoma Inicial	Histología	Grado	Recidiva
1	TP	M	56	Fosa olfatoria	5	Cefalea	Meningotelial	1	sí
2	TP	M	68	Frontal	2,8	Crisis comiciales	Transicional	1	no
3*	TP	V	34	Frontal	8	Déficit visual	Meningotelial	1	sí
4	Rec1	V	50	Parasagital	4,1	Déficit motor	Angiomatoso	3	sí
5	TP	M	51	Parasagital	2,2	Hallazgo casual	Fibroblástico	2	no
6	TP	M	49	Espinal	3	Déficit motor	Transicional	1	no
7	TP	M	83	Frontal	3,5	Déficit neurológico	Meningotelial	1	ns
8	Rec1	V	70	T-P	1,5	Déficit motor	Meningotelial	3	sí
9	Rec1	M	68	Parasagital	3	Déficit motor	Meningotelial	3	sí
10*	TP	V	65	Frontal	6,5	Hallazgo casual	Meningotelial	2	sí
11	TP	M	45	Fosa posterior	3,8	Déficit sensitivo	Secretor	1	no
12	TP	M	57	Frontal	3,8	Hallazgo casual	Fibroblástico	1	sí
13***	TP	V	53	Occipital	7	Déficit motor	Meningotelial	2	sí
14*	TP	M	57	Petroclival	4	Cefalea	Meningotelial	1	sí
15	Rec1	M	65	Sellar	4	Déficit visual	Meningotelial	2	sí
16	TP	V	79	Parietal	7,5	Crisis comiciales	Psamomatoso	1	sí
17*	TP	M	43	Occipital	5,9	Déficit visual	Meningotelial	1	sí
18	TP	M	45	Parasagital	3,5	Hallazgo casual	Transicional	2	no
19*	TP	V	46	Esfenoidal	5	Crisis comiciales	Transicional	3	sí
20	Rec1	V	71	Espinal	1,5	Déficit sensitivo	Meningotelial	1	sí
21	TP	V	65	Tentorio	5	Déficit visual	Fibroblástico	1	no
22	TP	M	67	Tentorio	4	Cefalea	Fibroblástico	1	no
23*	TP	M	64	Fosa olfatoria	6,5	Hallazgo casual	Transicional	1	sí
24	TP	M	74	Frontal	4	Déficit neurológico	Transicional	2	no
25	Rec1	M	43	Fosa posterior	1,5	Crisis comiciales	Meningotelial	1	sí
26	TP	M	67	Fosa posterior	5	Déficit motor	Transicional	1	no
27	TP	V	54	T-P	8	Cefalea	Transicional	2	ns
28	TP	M	55	T-P	2,2	Crisis comiciales	Transicional	1	no
29*	TP	M	49	Frontal	4	Déficit motor	Transicional	2	sí
30	TP	M	46	Fosa posterior	4	Cefalea	Fibroblástico	1	no
31	TP	M	69	Ventricular	6	Desorientación	Fibroblástico	1	sí
32	TP	V	65	Parietal	6,5	Déficit sensitivo	Meningotelial	1	no
33	TP	M	46	T-P	5	Cefalea	Fibroblástico	2	no
34	TP	M	45	Frontal	2,5	Hipertensión endocraneal	Fibroblástico	1	no
35	TP	V	73	Parasagital	2	Déficit neurológico	Meningotelial	1	no

Resultados

Caso	Muestra	Sexo	Edad	Localización	Diámetro	Síntoma Inicial	Histología	Grado	Recidiva
36	TP	V	66	Parietal	5	Déficit motor	Meningotelial	2	sí
37	TP	M	65	Esfenoidal	5	Desorientación	Fibroblástico	1	no
38	TP	M	70	Occipital	5,2	Déficit motor	Fibroblástico	1	no
39**	TP	V	66	Esfenoidal	5	Cefalea	Meningotelial en placa	2	sí
40	TP	M	70	Parietal	4	Hipertensión endocraneal	Angiomatoso	2	sí
41	TP	M	61	Frontal	3	Desorientación	Fibroblástico	1	no
42	TP	M	71	Parietal	2,9	Cefalea	Meningotelial	1	no
43	TP	M	66	Parasagital	3,5	Cefalea	Meningotelial	2	no
44	TP	M	53	Occipital	5	Desorientación	Transicional	1	sí
45	TP	V	68	Temporal	3	Hipertensión endocraneal	Transicional	1	no
46	TP	M	72	Espinal	2	Déficit motor	Transicional	1	ns
47	TP	V	79	Temporal	5	Desorientación	Meningotelial	1	no
48	TP	M	54	Fosa posterior	3	Cefalea	Fibroblástico	1	no
49	TP	M	60	T-P	7	Déficit sensitivo	Fibroblástico	1	sí
50	TP	M	66	Parietal	3,7	Hipertensión endocraneal	Secretor	1	no
51	TP	M	70	F-P	6	Crisis comiciales	Meningotelial	1	sí
52	TP	M	49	Parasagital	5	Déficit sensitivo	Psamomatoso	1	no
53	TP	M	51	Frontal	2,8	Hallazgo casual	Meningotelial	1	no
54	TP	M	66	Parasagital	3	Cefalea	Meningotelial	1	no
55	TP	M	57	T-P	3	Hallazgo casual	Atípico	2	no
56*	TP	M	55	Parasagital	10	Hipertensión endocraneal	Transicional	2	sí
57	TP	M	63	Parietal	3,2	Déficit sensitivo	Meningotelial	1	sí
58	Rec2	V	64	Fosa olfatoria	8	Déficit visual	Meningotelial	3	sí
59	Rec1	M	52	F-P	1	Déficit motor	Transicional	1	sí
60*	TP	V	53	Esfenoidal	7	Déficit visual	Atípico	2	sí
61	TP	M	68	Ventricular	1,3	Crisis comiciales	Psamomatoso	1	no
62	TP	M	34	Fosa posterior	5	Déficit neurológico	Meningotelial	2	no
63*	TP	V	7	Ventricular	3	Cefalea	Fibroblástico	1	sí
64	TP	M	64	Fosa olfatoria	5,5	Déficit visual	Psamomatoso	1	ns
65	Rec1	V	53	Frontal	3,5	Hipertensión endocraneal	Meningotelial	3	sí
66	TP	V	40	Parietal	4,5	Crisis comiciales	Meningotelial	1	no
67	TP	M	44	Espinal	1,6	Cefalea	Fibroblástico	1	no
68	TP	M	63	Parasagital	3,5	Desorientación	Meningotelial	1	sí

Caso	Muestra	Sexo	Edad	Localización	Diámetro	Síntoma Inicial	Histología	Grado	Recidiva
69	TP	M	67	Esfenoidal	5	Déficit motor	Transicional	1	sí
70	TP	V	28	Frontal	4	Crisis comiciales	Psamomatoso	1	no
71	TP	M	47	Occipital	5	Cefalea	Meningotelial	2	sí
72*	TP	M	66	Occipital	4	Déficit motor	Psamomatoso	1	sí
73	TP	M	65	Frontal	3,9	Cefalea	Fibroblástico	2	no
74	TP	M	66	Fosa posterior	2,5	Déficit sensitivo	Psamomatoso	1	no
75	TP	M	51	Parasagital	4,5	Déficit neurológico	Meningotelial	1	no
76	TP	M	70	Frontal	4	Cefalea	Angiomatoso	1	no
77	TP	M	71	Frontal	3,8	Crisis comiciales	Meningotelial	1	no
78	TP	M	59	Frontal	5,3	Crisis comiciales	Meningotelial	1	no
79	TP	M	56	Parietal	7	Déficit neurológico	Fibroblástico	1	sí
80	TP	M	71	Frontal	3	Desorientación	Meningotelial	1	no
81**	TP	V	58	Esfenoidal	2	Cefalea	Transicional	1	sí
82	TP	V	34	Esfenoidal	4,5	Cefalea	Transicional	2	sí
83	TP	M	69	Fosa posterior	4	Cefalea	Fibroblástico	1	sí
84	TP	M	60	Espinal	1,8	Déficit sensitivo	Transicional	1	no
85	TP	M	36	Espinal	1,5	Déficit neurológico	Psamomatoso	1	sí
86	TP	V	60	Esfenoidal	8	Déficit motor	Meningotelial	2	no
87	TP	M	41	Frontal	2	Déficit sensitivo	Transicional	1	no
88	TP	V	29	Esfenoidal	9	Hipertensión endocraneal	Meningotelial	1	ns
89	TP	M	82	Esfenoidal	3	Déficit sensitivo	Secretor	1	no
90	TP	M	58	Parasagital	4	Déficit sensitivo	Transicional	1	ns
91	TP	V	65	Sellar	2,8	Déficit visual	Meningotelial	1	no
92	TP	M	73	F-P	6,2	Desorientación	Fibroblástico	1	sí
93	TP	V	52	Fosa olfatoria	5,4	Déficit visual	Meningotelial	1	no
94	TP	M	70	Esfenoidal	3	Déficit visual	Transicional	2	no
95	TP	M	68	Frontal	4,8	Crisis comiciales	Metaplásico	1	no
96	TP	M	65	Sellar	2	Déficit sensitivo	Meningotelial	1	no
97	TP	V	88	Parasagital	4	Déficit neurológico	Transicional	1	ns
98	TP	M	72	Fosa posterior	3,6	Déficit sensitivo	Meningotelial	1	no
99	TP	M	44	Frontal	8	Déficit visual	Transicional	1	no
100*	TP	V	53	Esfenoidal	7	Déficit visual	Transicional	1	sí
101	TP	M	47	Fosa olfatoria	8	Déficit visual	Meningotelial	1	no

Datos clínicos de los pacientes incluidos en este estudio. M, mujer; F-P, fronto-parietal; TP, tumor primario; T-P, temporo-parietal; V, varón; *Caso en el que se estudia el tumor primario y una recidiva; ** Caso en el que se estudia el tumor primario y 2 recidivas; *** Caso en el que se estudia el tumor primario y 3 recidivas tumorales.

2 Estudio histopatológico

Se ha realizado el estudio histopatológico en 120 muestras tumorales procedentes de 101 pacientes. Comprenden 92 tumores primarios y 28 recidivas tumorales. Se exponen a continuación las características histológicas e histopatológicas de los meningiomas primarios y posteriormente, los resultados obtenidos en los tumores recidivados incluidos en el estudio.

2.1 Histopatología de los meningiomas primarios

Estudiamos la histopatología de 92 tumores primarios. Los tipos histológicos más frecuentes en esta serie fueron el meningotelial con 38 casos (37,6%), el fibroblástico con 19 casos (18,8%) y el transicional con 25 casos (24,8%). Con una frecuencia mucho menor, encontramos también 8 meningiomas psamomatosos, 3 angiomatosos, 3 secretorios, 2 meningiomas atípicos, 2 meningiomas anaplásicos y 1 meningioma metaplásico (figura 19). Siguiendo las recomendaciones de la OMS de 2007, los tumores se clasificaron en meningiomas de grado I, II y III considerando la pérdida del patrón estructural (*sheeting*), la prominencia nucleolar, el número de mitosis, la presencia de micronecrosis y la infiltración del tejido nervioso, además del pleomorfismo nuclear y la hiperplasia vascular, utilizados como criterios menores (figura 20). La distribución de muestras quedó como se describe a continuación:

- Meningiomas de grado I: 70 tumores primarios (76,1%)
- Meningiomas de grado II: 21 tumores primarios (22,8%)
- Meningioma de grado III: 1 tumor primario (1,1%)

La presencia de un único tumor de grado III en la serie de casos analizada nos llevó a evaluarlo conjuntamente con los tumores de grado II, de manera que en las comparaciones a lo largo de este trabajo se dispone de un grupo de 70 tumores de grado I frente a 22 tumores de grados superiores (grados II y III).

De manera global, el número de mitosis osciló entre 0 y 32 en 20 campos HPF. El índice mitótico medio en los meningiomas primarios fue de $2,0 \pm 3,7$ mitosis/20 HPF. El

promedio de los valores de Ki-67 medio fue de $1,4\pm 0,6$; el promedio de los valores de Ki-67 máximo fue de $1,7\pm 0,8$ (figura 21).

Las características clínico-patológicas de los tumores primarios, en función del grado histológico, se resumen en la tabla 8. En los 70 meningiomas primarios de grado I, la edad media al diagnóstico fue de 59,4 años, el 77,1% de los casos fueron mujeres y el 22,9% hombres. La localización más frecuente fue encefálica, concretamente en la región frontal. El tamaño medio de los tumores fue 4,2 cm y la histología más habitual fue la meningotelial. El número medio de mitosis fue de 1,1 mitosis/20 HPF y el marcaje de Ki-67 con los distintos métodos de valoración fue $1,51\pm 0,6$ (máximo) y $1,30\pm 0,5$ (medio).

En los 22 meningiomas de grados superiores, la edad media de presentación de la enfermedad fue de 55,7 años. De ellos, el 59,1% fueron mujeres y el 40,9% hombres. La localización más frecuente fue también la frontal. El diámetro mayor de los tumores fue de 5,1cm de media, con diferencias significativas entre hombres y mujeres ($p=0,018$). La histología más frecuente en estos tumores fue la transicional. El índice mitótico fue de 5,7 ($p=0,013$ con respecto a los de grado I). En el meningioma de grado III, el número medio de mitosis fue 4. El índice de Ki-67 fue 2 (máximo) y 1,5 (medio). Las diferencias entre los grados I y superiores, al valorar Ki-67 máximo y medio, fueron significativas tanto para Ki-67 máximo ($p=0,01$), como para Ki-67 medio ($p=0,012$).

Resultados

Tabla 8. Resultados clínico-patológicos en función del grado histológico en meningiomas primarios

Característica	TP grado I (n=70)	TP grado II (n=22)
Edad	59,4±14,1 Me 64	55,7±11,3 Me 55
Sexo	54 mujeres/ 16 hombres	13 mujeres/ 9 hombres (1 grado III)
Recidivan	18 casos	9 casos
<i>Localización</i>		
Supratentoriales	42	16
Base del cráneo	14	5 (4 grado II y 1 grado III)
Fosa Posterior	9	1
Espinales	5	0
<i>Tamaño</i>		
Tamaño	4,2±1,8cm Me=4,0	5,1±1,9cm Me=5
Tamaño mujeres	4,1±1,6	4,3±1,9
Tamaño hombres	4,9±2,1	6,2±1,4
<i>Histología</i>		
Meningotelial	26	8
Fibroblástico	16	3
Transicional	16	8 (7 grado II y 1 grado III)
Psamomatoso	8	0
Angiomatoso	1	1
Secretor	3	0
Atípico	0	2
Mitosis	1,1 Me=1,0	5,5 Me=4,0
Ki-67/MIB medio	1,3	1,7
Ki-67/MIB máximo	1,5	2,2
Casos que Recidivan	23	11
Tiempo a recidiva	52,1 meses	55,8 meses

(III), único tumor de grado III; Me, mediana; n, número de casos; TP, tumor primario.

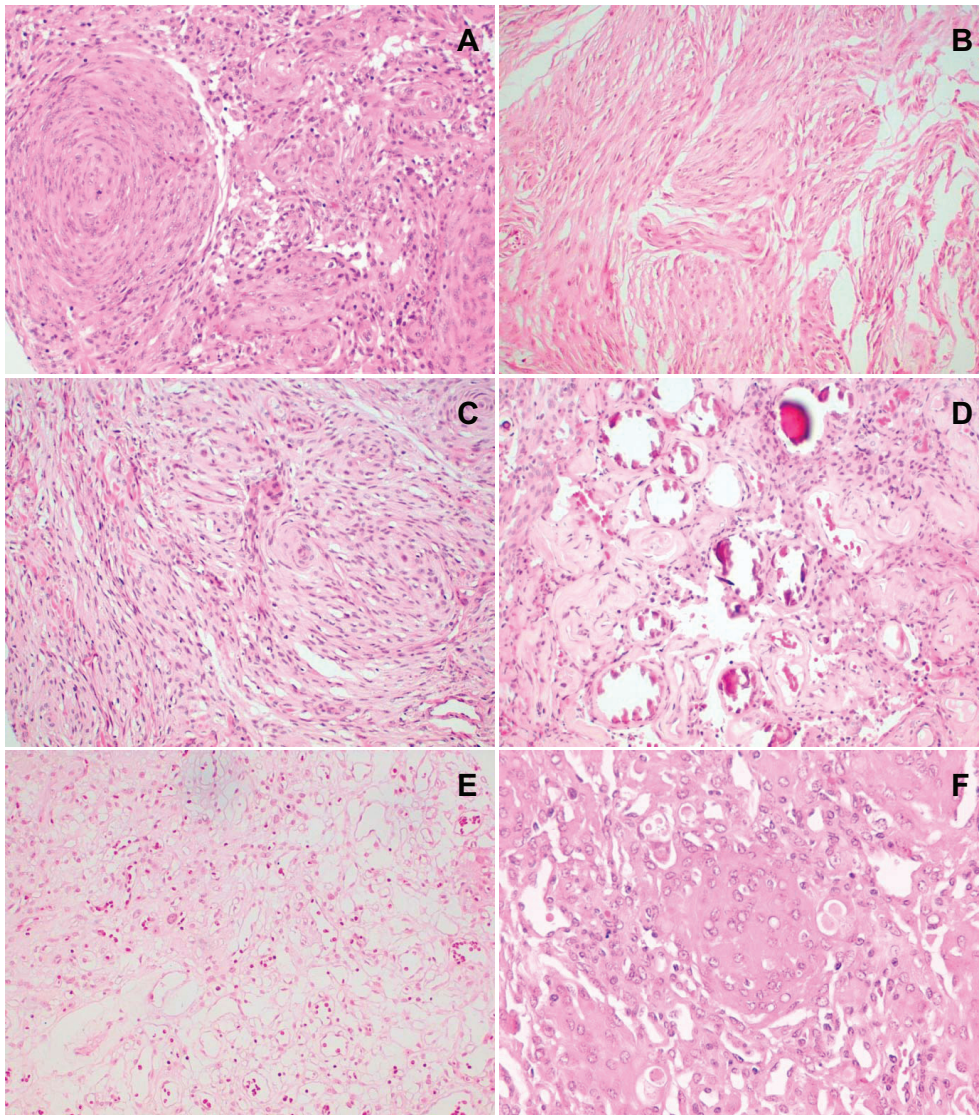


Figura 19. Morfología de los principales subtipos histológicos hallados en la serie de tumores estudiados (tinción de hematoxilina-eosina). Microfotografías a un aumento de 20X. A: meningioma meningotelial (caso 36). B: meningioma fibroblástico (caso 12). C: meningioma transicional (caso 44). D: meningioma psamomatoso (caso 61). E: meningioma angiomatoso (caso 76). F: meningioma secretor (caso 50).

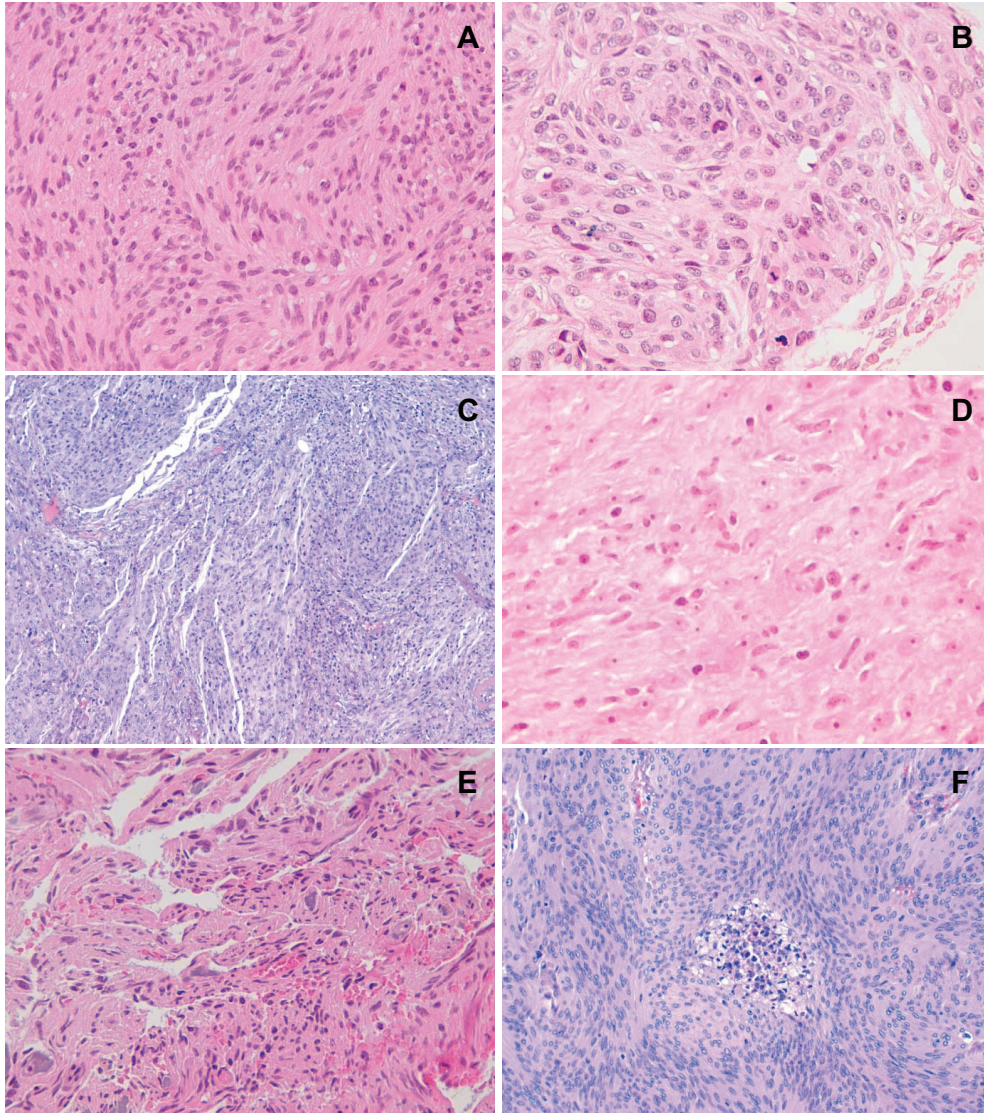


Figura 20. Microfotografías de secciones de meningioma teñidas con hematoxilina-eosina, representativas de los criterios histopatológicos utilizados para clasificar las muestras. A: pleomorfismo nuclear (caso 55, 20X). B: elevado índice mitótico (caso 86, 20X). C: incremento en la celularidad (caso 10, 4X). D: prominencia nucleolar (caso,36, 20X). E: pérdida del patrón de crecimiento (caso 60, 10X). F: focos de necrosis (caso 65, 4X).

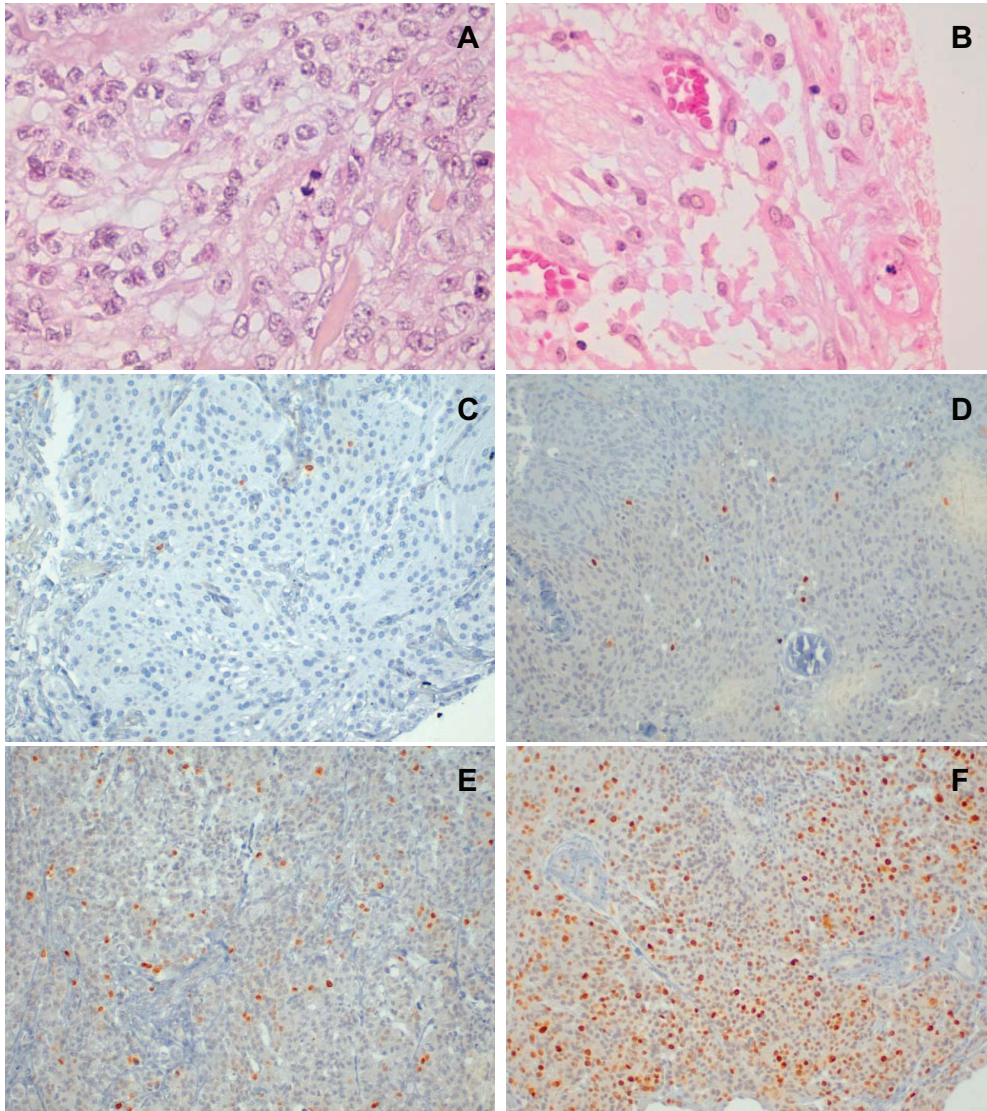


Figura 21. Microfotografías representativas del estudio de marcadores de proliferación celular. A-B: mitosis, C-F: Ki-67. A: segunda recidiva de meningioma de células claras grado II (caso 39). B: tumor primario de meningioma meningotelial, grado II (caso 13). C: tumor primario, meningioma meningotelial grado I, con bajo índice Ki-67 (caso 42). D: tumor primario, meningioma meningotelial grado I con moderado índice Ki-67 (caso 14). E: tumor primario, meningioma atípico grado II, con alto índice Ki-67 (caso 60). F: recidiva 1, meningioma de células claras, grado II con muy alto índice Ki-67 (caso 60).

2.2 Histopatología de los meningiomas recidivados

Estudiamos 28 recidivas tumorales procedentes de 24 pacientes, 10 mujeres y 14 hombres. De ellas, 24 eran primeras recidivas, 3 eran segundas recidivas y 1 fue la tercera recidiva de un paciente. En 19 casos se incluyó el tumor primario en la serie de meningiomas primarios estudiados. En cuanto a la histología, 13 muestras fueron meningiomas meningoteliales, 6 tumores transicionales, 3 de células claras, 4 anaplásicos, 1 meningioma fibroblástico y 1 angiomatoso. El estudio de la proliferación celular mostró un índice de mitosis medio de $4,7 \pm 3,9/20$ HPF y un índice de Ki-67 medio de $1,7 \pm 0,7$ máximo de $2,3 \pm 1,7$ de promedio.

La distribución por grados histopatológicos en las recidivas fue la siguiente:

- Meningiomas de grado I: 7 recidivas tumorales (25,0%)
- Meningiomas de grado II: 11 recidivas tumorales (39,3%)
- Meningiomas de grado III: 10 recidivas tumorales (35,7%).

Las características clinicopatológicas en función del grado histológico de las recidivas analizadas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados clínicos y anatomopatológicos en función del grado histológico en meningiomas recidivados

Característica	Recidivas grado I (n=10)	Recidivas grados II-III (n=18)
Edad	52,8±17,5	63,0±3,9
Sexo	5 mujeres / 5 hombres	5 mujeres /13 hombres
<i>Localización</i>		
Supratentoriales	4	12
Base del cráneo	4	6
Fosa Posterior	1	0
Espinales	1	0
<i>Tamaño</i>		
Tamaño mujeres	3,4±2,1	4,1±0,7
Tamaño hombres	4,05±1,9	4,1±2,0
<i>Histología</i>		
Meningotelial	9	11
Fibroblástico	1	0
Transicional	0	2
Angiomatoso	0	1
Anaplásico	0	1
Metaplásico	0	0
células claras	0	3
Mitosis	1,8 Me=2	6,33 Me=6
Ki-67/MIB medio	1,55	1,78
Ki-67/MIB máximo	2	2,39

Me, mediana; n, número de casos.

3 Estudios citogenéticos

3.1 Cultivo "in vitro"

Un total de 70 tumores procedentes de 63 pacientes se adaptaron a las condiciones de cultivo "in vitro". De ellos, 57 eran meningiomas primarios y 13 eran recidivas. Los cultivos fueron observados a diario y cuando alcanzaron el índice mitótico adecuado para realizar el estudio citogenético, se fotografiaron y se sacrificaron para la obtención del cariotipo. Cuando el número de células lo permitió, se congelaron viales de varios pases. Los estudios citogenéticos se realizaron en cultivos a corto plazo, entre los 7 y 15 días tras la siembra. La morfología de las células en cultivo fue variada. La figura 22 muestra la morfología de las células en algunos casos representativos.

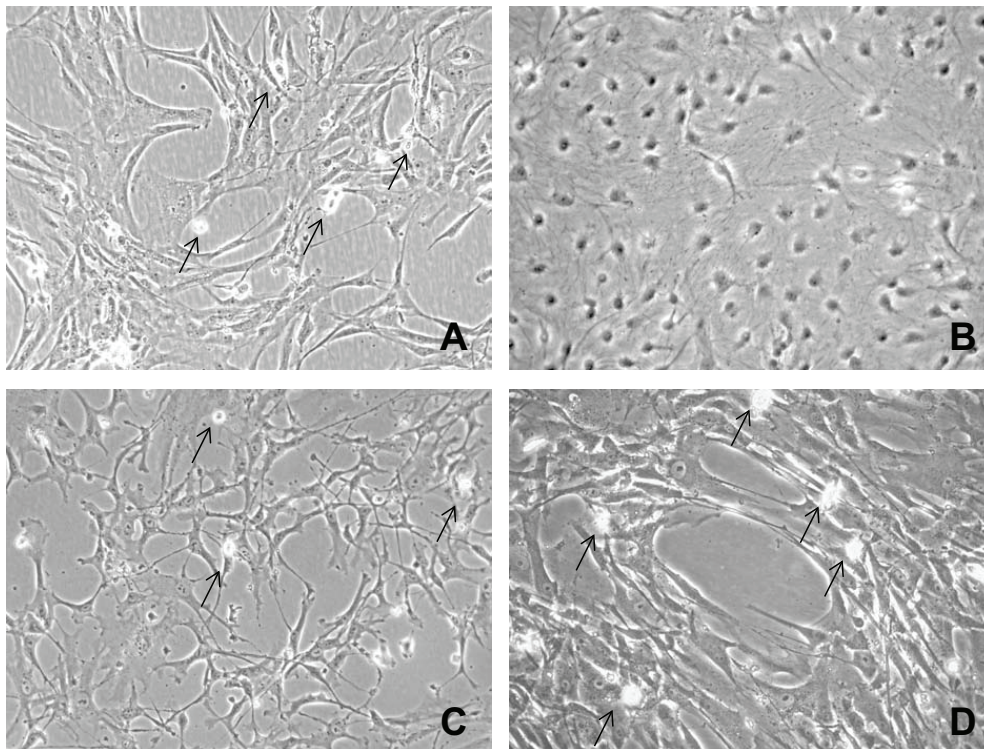


Figura 22. Microfotografías de meningiomas adaptados a las condiciones de cultivo "in vitro" (20x). A: meningioma sincitial, con células de morfología fusocelular. B: meningioma transicional con patrón de crecimiento pseudo-epitelial. C: meningioma psamomatoso con células estrelladas, con prolongaciones. D: meningioma secretor con células fusiformes densas, oscuras. Nótese la actividad mitótica, señalada con flechas.

3.2 Cariotipo

En los cariotipos obtenidos de los 70 tumores que se adaptaron al cultivo “*in vitro*”, el número modal varió entre 41 y 46 cromosomas, que supuso un rango hipodiploide en 31 casos, pseudodiploide en 5 casos y diploide en 34 casos. De los 70 meningiomas estudiados citogenéticamente, 32 no presentaron alteraciones (45,7%), 19 presentaron alteraciones numéricas exclusivamente (27,1%), 2 tumores mostraron alteraciones estructurales únicamente (2,9%) y 17 presentaron ambos tipos de alteraciones, numéricas y estructurales (24,3%).

Los cariotipos se formularon siguiendo las recomendaciones de la ISCN de 2009 ⁽²⁸²⁾. La figura 23 refleja el grado de afectación de cada uno de los cromosomas en los meningiomas estudiados.

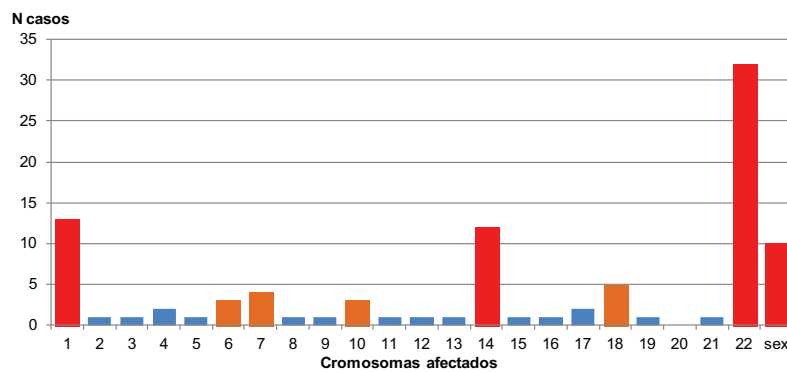


Figura 23. Relación entre el número total de casos con alteraciones cromosómicas clonales con respecto a cada uno de los cromosomas. Obsérvese que los cromosomas más afectados son el 22, el 1, el 14 y los cromosomas sexuales. Sex, gonosomas.

3.3 Anomalías cromosómicas en meningiomas primarios

En conjunto, en el estudio citogenético de los meningiomas primarios (n=57) encontramos 25 casos que no presentaron alteraciones en el cariotipo (43,9%), 18 tumores mostraron alteraciones exclusivamente numéricas (31,6%), 2 casos presentaron únicamente alteraciones estructurales (3,5%), y 12 casos presentaron ambos tipos de alteraciones (21,0%) (figura 24). Las fórmulas cromosómicas se muestran en la tabla 10.

Las alteraciones numéricas halladas afectaron, en 23 casos al cromosoma 22 (40,4%), en 7 casos a los cromosomas sexuales (12,3%), en 4 casos al cromosoma 14 (7,0%) y en casos únicos a los cromosomas 6, 7, 10, 15, 17, 18 y 19. Un caso mostró metafases tetraploides (caso 37) y 2 casos fueron poliploides (casos 89 y 91). En 3 casos se observaron cromosomas marcadores de origen desconocido (casos 21, 27 y 88) (figura 25A).

Las alteraciones estructurales de estos tumores afectaron al cromosoma 1 en 10 casos (17,5%), en 3 casos al cromosoma 14 (5,3%), en 2 casos a los cromosomas 4, 7, 18 ó 22 (3,5%), y en un solo caso a los cromosomas 3, 6, 8, 11, 13, 17 y 21 (figura 25B). Cabe destacar que un caso presentó amplificación génica en forma de dobles minutos (caso 28).

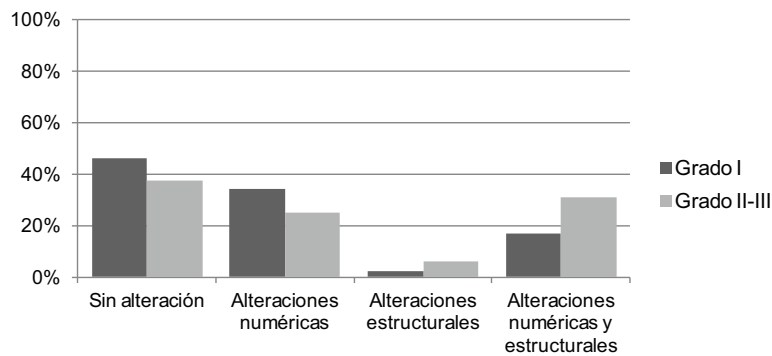


Figura 24. Distribución de los distintos tipos de alteraciones detectadas en meningiomas primarios en los diferentes grados histológicos.

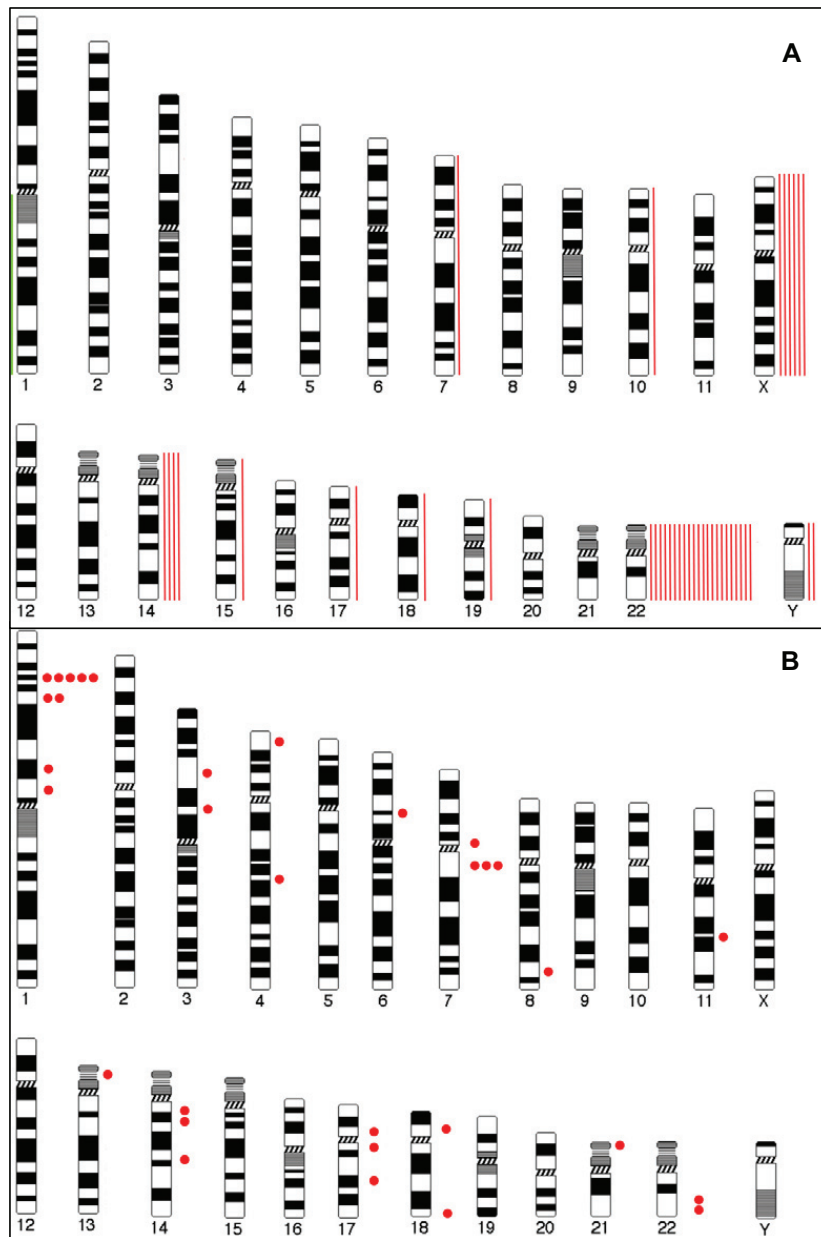


Figura 25. Ideograma que muestra las alteraciones cromosómicas clonales halladas en los meningiomas primarios analizados, variación de Barsh *et al.* ⁽²⁸⁹⁾. A: alteraciones numéricas. Las líneas rojas señalan las pérdidas de cromosomas enteros y la línea verde la única ganancia hallada. B: alteraciones estructurales. Los círculos rojos señalan los puntos de rotura. No se representan los cromosomas especiales detectados ni las alteraciones de la ploidía.

Tabla 10. Fórmulas cromosómicas de los 57 meningiomas primarios analizados

N	Caso	Grado	Fórmula
1	1	1	46,XX/ inestabilidad
2	2	1	46,XX
3	3	1	46,X,-Y,+C
4	5	2	43,X,-X,del(1)(p?),-10,-22
5	6	1	45,XX,-22
6	10*	2	46,XY/ inestabilidad
7	13***	2	46,XY
8	17	1	45,XX,-22/46,XX,tas(13;21)/46,XX inestabilidad
9	18	2	46,XX
10	19*	3	46,XY
11	21	1	46,XY,der(4)t(4;6)(p16;p21),-14,der(17)t(17;17)(p11;q11-q22),del(22)(q13),+mar/ 46,XY
12	22	1	46,XX
13	24	2	45,XX,del(1)(p13),-22
14	26	1	46,XX
15	27	2	44,XY,del(1)(p21),-14,-18,-22,+1microcromosoma
16	28	1	46,XX, dmin / inestabilidad
17	29	2	43,X,-X,-15,-22
18	31	1	46,XX
19	32	1	46,XY
20	33	2	45,XX,del(1)(p32),del(4)(q25),t(8;11)(q24;q21),t(14;22),(q32;q12),-22
21	37	1	46,XX/ tetraploide / inestabilidad
22	40	2	46,XX,del(14)(q22)/46,XX
23	41	1	46,XX
24	42	1	46,X,-X,+1q,-22
25	43	2	46,XX/ inestabilidad
26	44	1	44,XX,-7,der(14)t(7;14)(p11;q11),-17,der(18)t(7;18)(q11;q23)
27	45	1	46,XY
28	46	1	44,X,-X,-22
29	48	1	45,XX,-22/ inestabilidad
30	49	1	46,XX
31	50	1	46,XX
32	52	1	45,XX,-22
33	53	1	46,XX
34	54	1	46,XX,der(1)t(1;3)(p32;p21),der(3)t(3;7)(p13;q11),der(7)t(7;?)(q11;?)
35	56*	2	46,XX
36	57	1	46,XX

N	Caso	Grado	Fórmula
37	61	1	45,XX,-22
38	62	2	44,XX,-19,-22
39	64	1	46,XX
40	71	2	43,X,-X,-14,-22
41	74	1	45,XX,-22
42	81	1	45,XY,-22/ inestabilidad
43	82	2	46,XY,-14,+mar
44	83	1	44,X,-X,-22/46,XX
45	84	1	46,XX
46	86	2	45,XY,del(1)(p?),-18p,-22
47	87	1	45,XX,-22/ inestabilidad
48	88	1	46,XY,-22,+mar
49	89	1	46,XX/ inestabilidad/ poliploide
50	91	1	44,X,-Y,-22/poliploide
51	92	1	45,XX,del(1)(p?)-22
52	95	1	46,XX/ inestabilidad
53	96	1	46,XX
54	97	1	45,XX,del(1)(p?)-22
55	98	1	46,XX
56	99	1	45,XX,del(1)(p?)-22
57	101	1	46,XX

Se señalan con asterisco (*) los casos cuyas recidivas tumorales fueron estudiadas; el número de asteriscos representa el número de recidivas analizadas. N, número de caso con estudio citogenético; *dmin*, dobles minutos; *mar*, cromosoma marcador; *tas*, asociación telomérica.

3.3.1 Implicación de las alteraciones cromosómicas en función del grado histológico en meningiomas primarios

A continuación se resumen las alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales en los 57 meningiomas primarios estudiados, según el grado histológico (tabla 11). La proporción de casos con cariotipos normales, con manifestaciones de inestabilidad, o con alteraciones en los cromosomas sexuales, fue similar en los meningiomas de grado I y en los de grados superiores analizados. La alteración del cromosoma 22 fue la más frecuente en ambos grupos y próxima al 50% de los casos. La monosomía total o parcial del cromosoma 14 fue superior en los tumores primarios de grado II ($p=0,015$). Las alteraciones que afectaban al cromosoma 1 fueron también superiores en los

meningiomas de grado II, sin alcanzar significación estadística ($p=0,06$). La presencia de alteraciones en otros cromosomas fue relativamente mayor en los meningiomas primarios de grado II, si bien esta diferencia tampoco fue significativa (figura 26).

Cuando agrupamos los tumores en casos con 1) cariotipos normales o pérdidas en el cromosoma 22, 2) tumores con alteraciones del cromosoma 1 o el 14, y 3) tumores con otras alteraciones, encontramos diferencias significativas en el grupo 2, ya que eran más frecuentes en los tumores de grado II ($p=0,005$). Cabe mencionar que la alteración simultánea de los cromosomas 1 y 14 se dio únicamente en 2 tumores de grado II. Los tumores con cariotipos normales o alteraciones del cromosoma 22 fueron 1,7 veces más frecuentes en los meningiomas de grado I, (63,4% vs 37,5%) si bien esta diferencia no fue significativa ($p=0,076$). A la luz de estos resultados, podemos concluir que:

- Los tumores primarios de grado I presentaron más frecuentemente cariotipos normales o cariotipos con alteraciones numéricas únicamente (habitualmente, la pérdida de un cromosoma 22); de hecho, solo un meningioma primario de grado I presentó exclusivamente alteraciones estructurales (caso 54).
- Los meningiomas primarios de grados superiores presentaron con mayor frecuencia la coexistencia de alteraciones numéricas y estructurales que las alteraciones de un tipo u otro aisladas (figura 25).

Tabla 11. Alteraciones citogenéticas en los meningiomas primarios analizados, en función del grado histológico que mostraban los tumores

N=57	TP grado I		TP grado II		Total TP
Normal	19	46,3%	6	37,5%	25
Alteración #22	17	41,5%	8	50,0%	25
Alteración #1	4	9,8%	5	31,3%	9
Alteración #14	2	4,9%	5	31,3%	7
Otras alteraciones	10	24,4%	7	43,8%	17
Inestabilidad	12	29,3%	4	25,0%	16
Alteración #sexuales	5	12,2%	3	18,8%	8

#, cromosoma; TP, tumores primarios. Se señalan en negrita las diferencias estadísticamente significativas.

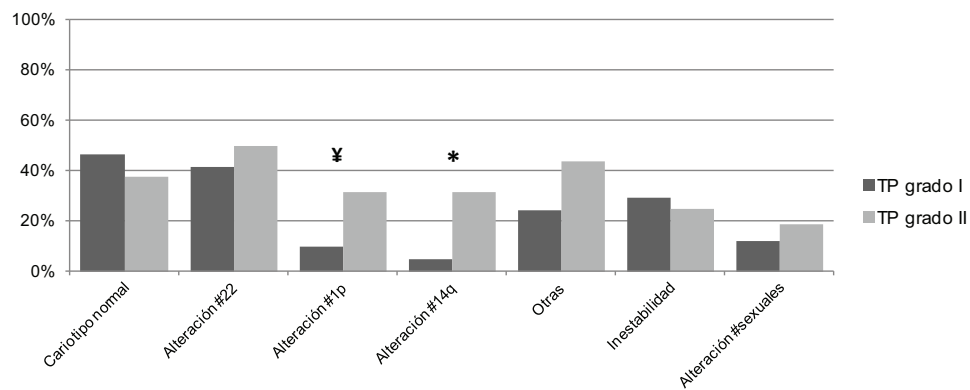


Figura 26. Distribución de las alteraciones citogenéticas en los meningiomas primarios de grado I y II. ¥, diferencia próxima a la significación estadística; *, diferencia estadísticamente significativa; #, cromosoma; TP, tumor primario.

3.4 Anomalías cromosómicas en meningiomas recidivados

En las recidivas de meningioma (n=13) encontramos las siguientes alteraciones numéricas: 6 casos con pérdidas de un cromosoma 22 (46,2%), 4 casos con monosomía del 14 (30,7%), 3 casos con pérdidas de uno de los cromosomas sexuales (23,1%), 2 casos perdieron un cromosoma 10 y otros 2 casos, un cromosoma 18 (15,4%) y, por último, de manera única, se vieron afectados los cromosomas 5, 6, 9, 12 y 16 (7,7%) (figura 27A). Además, cabe mencionar que una de las recidivas mostró metafases triploides y tetraploides, un cromosoma marcador y uno en anillo (tercera recidiva del caso 13). Las alteraciones estructurales en las recidivas tumorales afectaron al cromosoma 1 en 3 casos (23,1%), al cromosoma 14 en 3 casos (23,1%), al cromosoma 7 en 2 casos, en un solo caso al cromosoma 6 y, en otro caso, al cromosoma 22 (figura 27B). Las fórmulas cromosómicas se muestran en la tabla 12.

Entre estos meningiomas recidivados, hallamos: 5 casos que no presentaron ninguna alteración en el cariotipo (38,5%), 3 casos con alteraciones exclusivamente numéricas (23,1%) y 5 con alteraciones numéricas y estructurales (38,5%).

Es interesante señalar que las recidivas de grado I presentaron cariotipos normales o exclusivamente anomalías numéricas, mientras que las de grado II y III mostraron anomalías numéricas y estructurales simultáneamente. Ninguna recidiva mostró sólo alteraciones estructurales (figura 28).

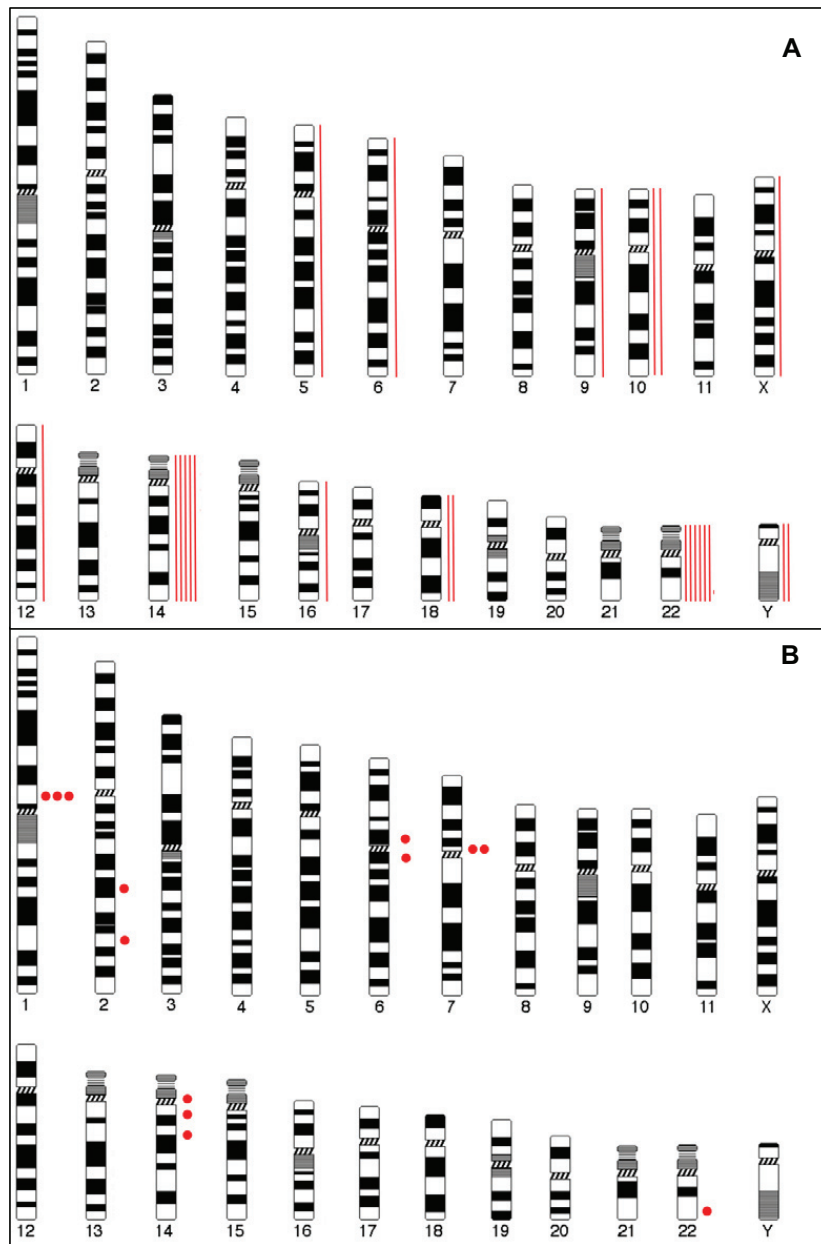


Figura 27. Ideograma que muestra las alteraciones cromosómicas clonales en recidivas de meningioma, variación de Barsh *et al.* ⁽²⁸⁹⁾. A: alteraciones numéricas. Las líneas rojas señalan las pérdidas de cromosomas enteros. B: alteraciones estructurales. Los círculos rojos señalan los puntos de rotura. No se representan los cromosomas especiales detectados ni las alteraciones de la ploidía.

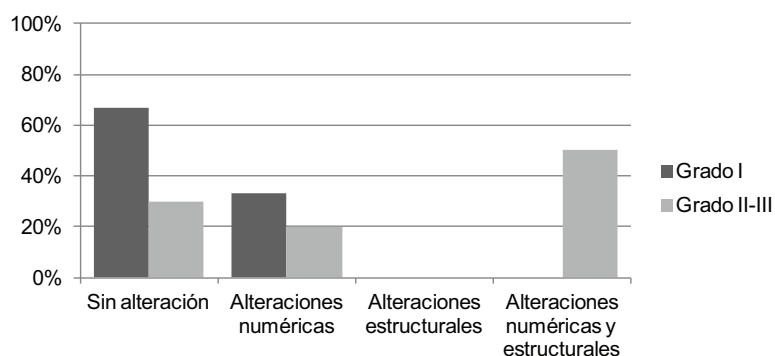


Figura 28. Tipos de alteraciones cromosómicas detectadas en meningiomas recidivados en función del grado histológico.

Tabla 12. Fórmulas cromosómicas en los meningiomas recidivados

N	Caso	Grado	Fórmula
R1	4	3	46,XY
R2	8	3	44,X,-Y,-22
R3	9	3	43,XX,der(1)t(1;14)(p11;q11),-6,der(7)t(7;?)(p11;?),-14,-22
R4	10	3	44,X,-Y,del(2)(p24q33),-22
R5	13	2	46,XY
R6	13	3	46,XY/ inestabilidad
R7	13	3	41,XY,t(1;14)(p11;p13),-5,+dic(6;?)(q22;?),del(7)(p11),-9,-10,-12,-16,-18,tas(14;22)(p13;q13),+r,+mar/ triploide -tetraploide; roturas, inestabilidad <i>dmin</i>
R8	15	2	45,XX,-14,Dq+
R9	19	3	42,XY,der(1)t(1;14)(p11;q11),-10,-14,-18,-22/46,XY
R10	23	1	45,XX,-22/46,XX
R11	25	1	46,XX
R12	56	2	43,X,-X,-14,-22
R13	59	1	46,XX

R, recidiva; *dmin*, dobles minutos; mar, cromosoma marcador; r, cromosoma en anillo.

3.4.1 Implicación de las alteraciones cromosómicas en función del grado histológico en recidivas de meningioma

En la tabla 13 se recogen las alteraciones citogenéticas detectadas en las 13 recidivas de meningioma estudiados. En este subgrupo el tamaño de la muestra limita el análisis estadístico, de manera que únicamente encontramos que alteraciones en cromosomas distintos al 1, al 14 y al 22 son más frecuentes en las recidivas de grados superiores ($p=0,033$). No obstante a la luz de los resultados, las recidivas que mantienen el grado I de agresividad suelen tener cariotipos normales o solo alteraciones del cromosoma 22, mientras que las demás alteraciones citogenéticas son más patentes en las recidivas de grados superiores (figura 29).

Tabla 13. Alteraciones citogenéticas en meningiomas recidivados en función del grado histológico

N=41	Rec grado I		Rec grado I-III		Total
Normal	2	66,7%	3	30,0%	5
Alteración #22	1	33,3%	6	60,0%	7
Alteración #1	0	0,0%	3	30,0%	3
Alteración #14	0	0,0%	5	50,0%	5
Otras alteraciones	0	0,0%	7	70,0%	7
Inestabilidad	0	0,0%	2	20,0%	2
Alteración #sexuales	0	0,0%	3	30,0%	3

#, cromosoma; Rec, recidiva.

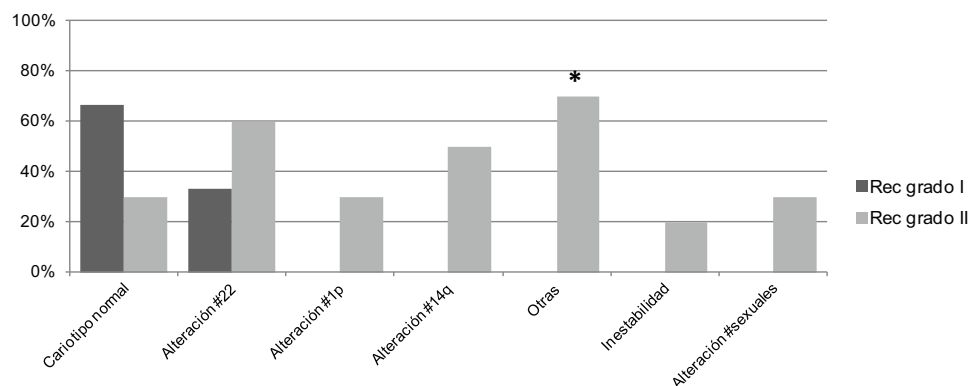


Figura 29. Distribución de las alteraciones citogenéticas en las recidivas de grado I y II-III. *, diferencias estadísticamente significativas; #, cromosoma; Rec, recidiva.

3.5 Otras alteraciones citogenéticas encontradas

En 13 casos (11 meningiomas primarios y 2 recidivas) hallamos metafases con inestabilidad cromosómica en forma de alteraciones citogenéticas no clonales. De ellos, 5 casos mostraron cariotipos principalmente normales (tumores primarios de los casos 1, 10, 43, 95 y primera recidiva del caso 13) y 3 mostraron alteraciones clonales que afectaban al cromosoma 22 (casos 48, 81 y 87). También detectamos amplificación, en forma de dobles minutos (casos 13 y 28), cariotipo tetraploide (caso 37) o cariotipo poliploide (caso 89). Por último, hallamos inestabilidad cromosómica que produjo mosaicismo de cariotipos más complejos (caso 17 y en la tercera recidiva del caso 13). La inestabilidad cromosómica fue más frecuente en hombres (50,0%) que en mujeres (20,9%).

Las alteraciones no clonales halladas supusieron ganancia de cromosomas enteros (cromosomas 2, 3, 9 y 10), trisomías parciales (cromosomas 1 y 17), pérdidas aleatorias de cromosomas, roturas y reestructuraciones. Los reordenamientos más prevalentes fueron las asociaciones teloméricas que con frecuencia implicaron a cromosomas acrocéntricos (tabla 14).

Tabla 14. Inestabilidad cromosómica detectada en las muestras analizadas

N	Caso	Fórmula Cromosómica
P1	1	46,XX/45,XX,-7[2]/47,XX,+10[1]/45,XX,tas [1]
P6	10	46,XY/pérdidas y alteraciones aleatorias
P8	17	45,XX,-22/46,XX,tas(13;21)/46,XX,break 9q [1],+ microcromosoma [1]
P16	28	46,XX/46,XX,tas(11;19)(q25;q13)[1]/46,XX,tas(13;21)(q34;p13) [1]/ 46,XX, tas (14;12)(p13;q13) [1] /+pérdida y alteraciones aleatorias [3]; dmin [3]
P21	37	46,XX/pérdidas y alteraciones aleatorias [3]; tetraploide [2]
P25	43	46,XX/pérdidas y alteraciones aleatorias [3]
P29	48	45,XX,-22/ 46,XX,tas(13;19)(p13;q13) [1]/46,XX,tas(2;22)(q37;q13) [1]
P42	81	45,XY,-22/46,XY,tas[1],46,XY,puv [1]
P47	87	45,XX,-22 /46,XX,tas[1],46,XX,end [1]
P49	89	46,XX/poliploidía [2]/trisomía [1]/47,XX,+9 [1]
P52	95	46,XX/48,XX,+2,+3 [1]/47,XX,+1p,+17p, mar [1]
R6	13	46,XY/pérdidas y alteraciones aleatorias
R7	13	41,XY,t(1;14)(p11;p13),-5,+dic(6;?)(q22;?),del(7)(p11),-9,-10,-12,-16,-18,tas(14;22)(p13;q13), +r,+mar [18]/ triploide-tetraploide [8];breaks [2]; dmin [2]

end, endoreduplicación; dmin, dobles minutos; mar, cromosoma marcador; r, cromosoma en anillo; R, recidiva tumoral; tas, asociación telomérica; P, tumor primario; puV, pulverización; [n], número de metafases en el cariotipo señalado.

Algunos cariotipos representativos de las alteraciones halladas en meningiomas primarios y recidivas se muestran en las figuras 30 a 35. Se incluyen cariotipos con anomalías representativas en meningiomas primarios de grado I (figuras 30 y 31), grado II (figuras 32 y 33) y en recidivas de meningiomas (figuras 34 y 35).

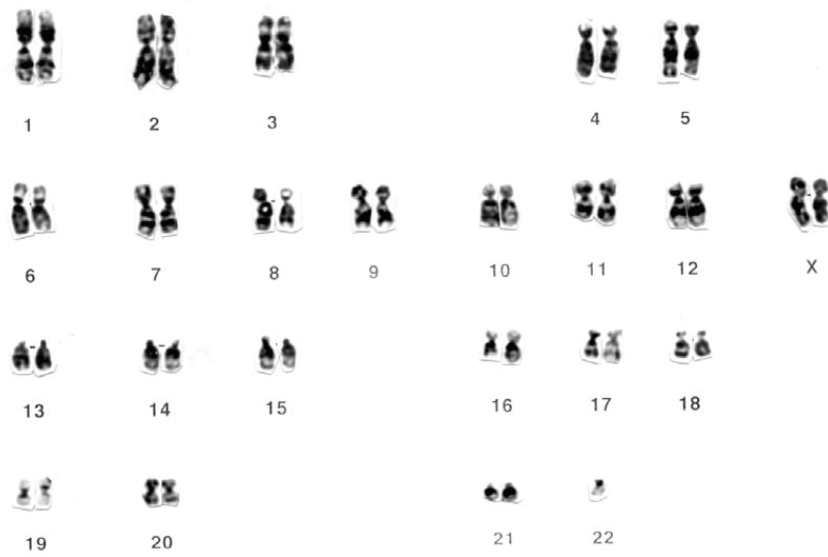


Figura 30. Cariotipo de un meningioma primario de grado I (caso 52), con una única alteración cromosómica: la pérdida de un cromosoma 22. Fórmula: 45,XX,-22.

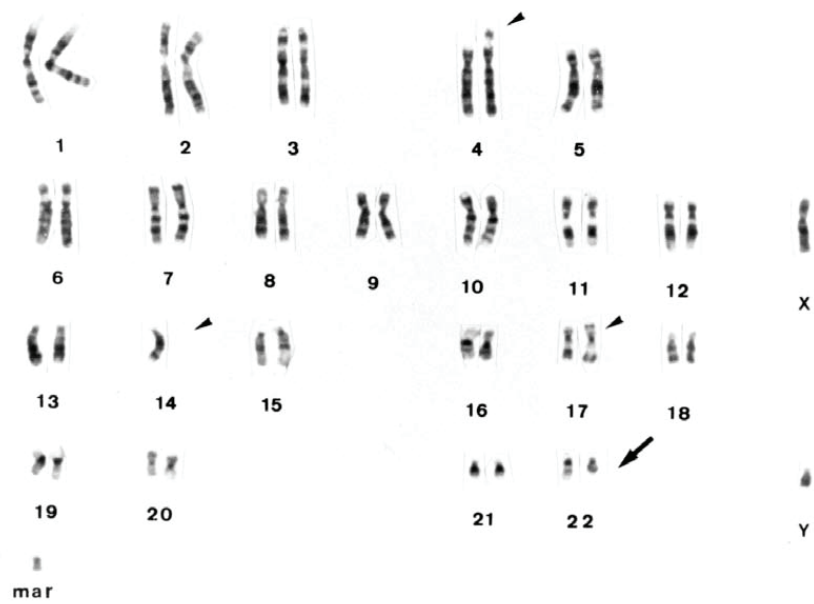


Figura 31. Cariotipo de un meningioma primario de grado I (caso 21) con múltiples alteraciones cromosómicas. Fórmula: 46,XY,der(4)t(4;6)(p16;p21),-14,der(17)t(17;17)(p11;q11-q22),del(22)(q13),+mar.

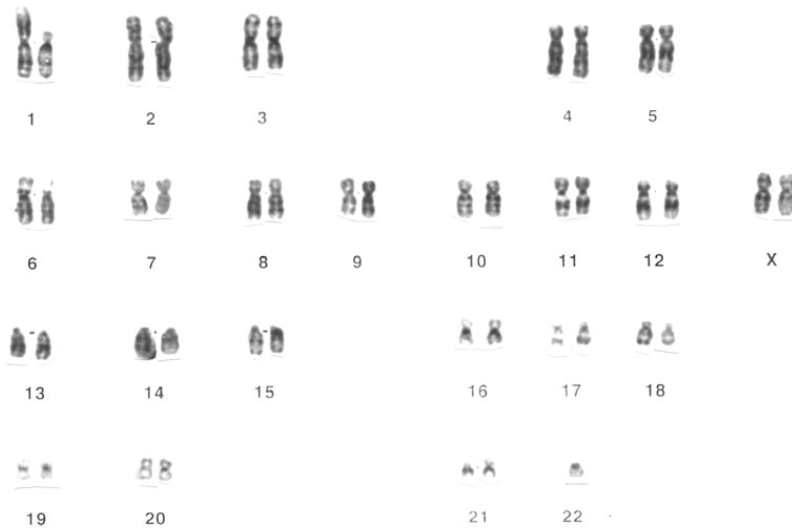


Figura 32. Cariotipo correspondiente a un meningioma primario grado II (caso 24) con pérdida de un cromosoma 22 y deleción parcial del cromosoma 1. Fórmula 45,XX,del(1)(p13),-22.

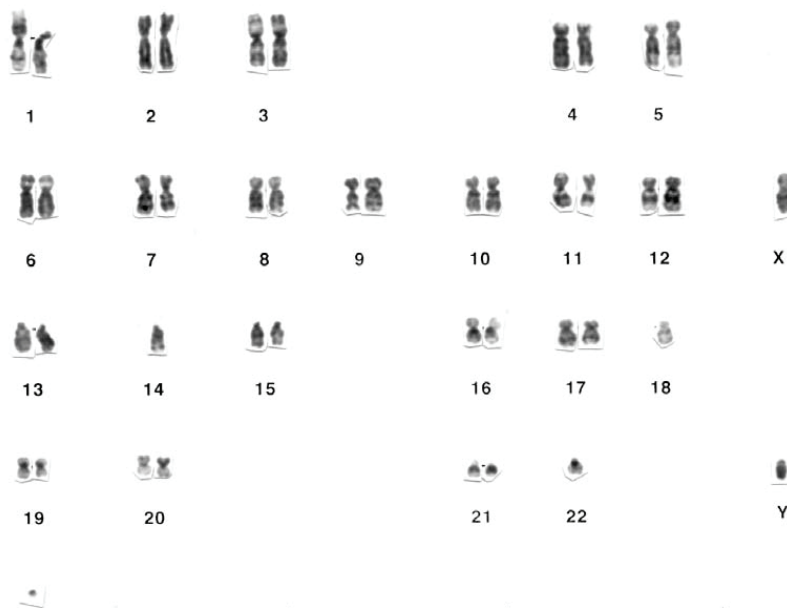


Figura 33. Cariotipo de un meningioma primario grado II (caso 27). Fórmula 44,XY,del(1)(p21),-14,-18,-22,+1microcromosoma.

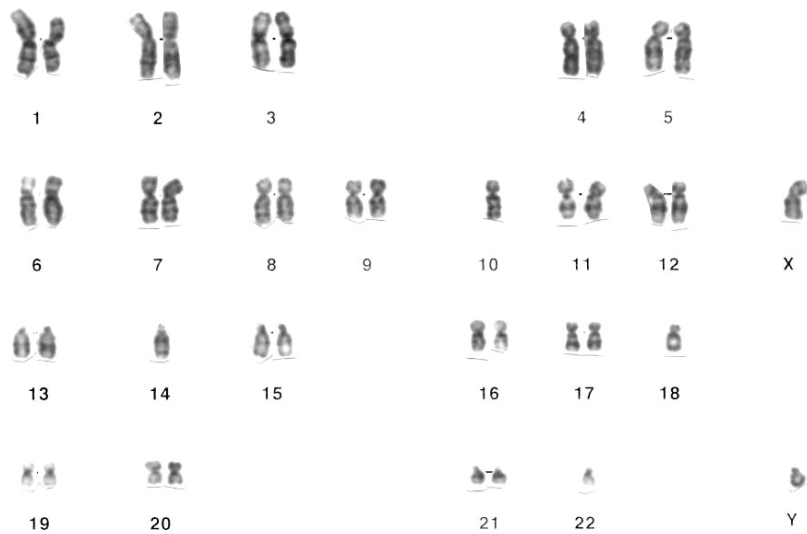


Figura 34. Cariotipo de células procedentes de una recidiva de meningioma, grado III (caso 19). El cariotipo muestra afectación de los cromosomas más relacionados con la agresividad de los meningiomas. Fórmula 42,XY,der(1)t(1;14)(p11;q11),-10,-14,-18,-22.

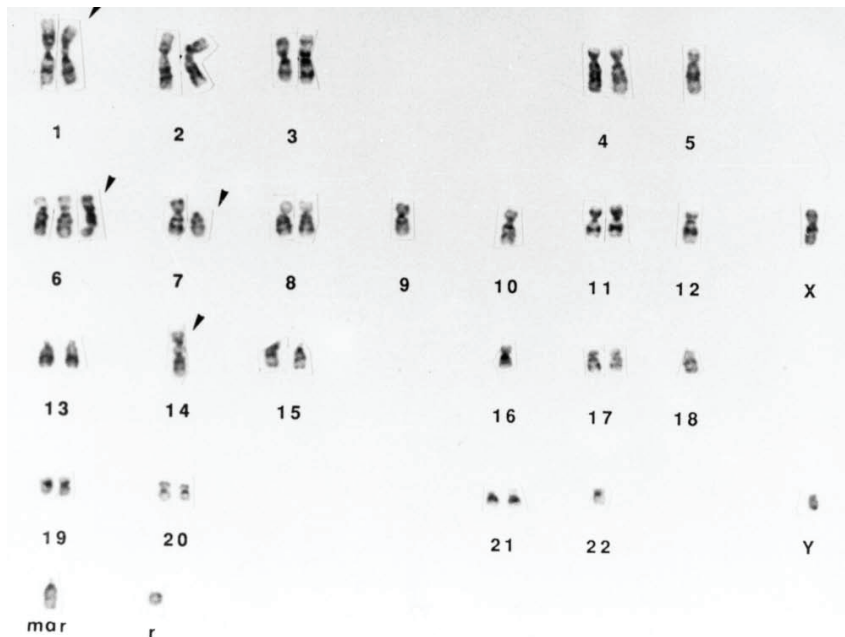


Figura 35. Cariotipo de células procedentes de una recidiva de meningioma, grado III (caso 13) con cariotipo complejo: incluye un cromosoma de origen desconocido (mar) y un cromosoma en anillo. Fórmula 41,XY,t(1;14)(p11;p13),-5,+dic(6;?) (q22;?),del(7)(p11),-9,-10,-12,-14,-16,-18,tas(14;22) (p13;p13),+r,+mar.

4 Estudios citogenéticos: hibridación “*in situ*” de fluorescencia

Un total de 70 muestras se analizaron mediante hibridación “*in situ*” fluorescente de sondas específicas de *locus* en los cromosomas 1, 14 y 22, sobre micromatrices tisulares. Del conjunto de muestras estudiadas, 61 fueron meningiomas primarios y 9 fueron recidivas tumorales. De ellas, en 50 casos encontramos alteraciones que afectaban a los cromosomas 22 y/o 1 y/o 14 mientras que 20 no presentaron alteración en ninguno de los tres cromosomas estudiados (figura 36). En conjunto detectamos:

- Deleciones en 22q: 40 casos (57,1%)
- Deleciones en 1p: 23 casos (32,9%)
- Deleciones en 14q: 20 casos (28,5%)

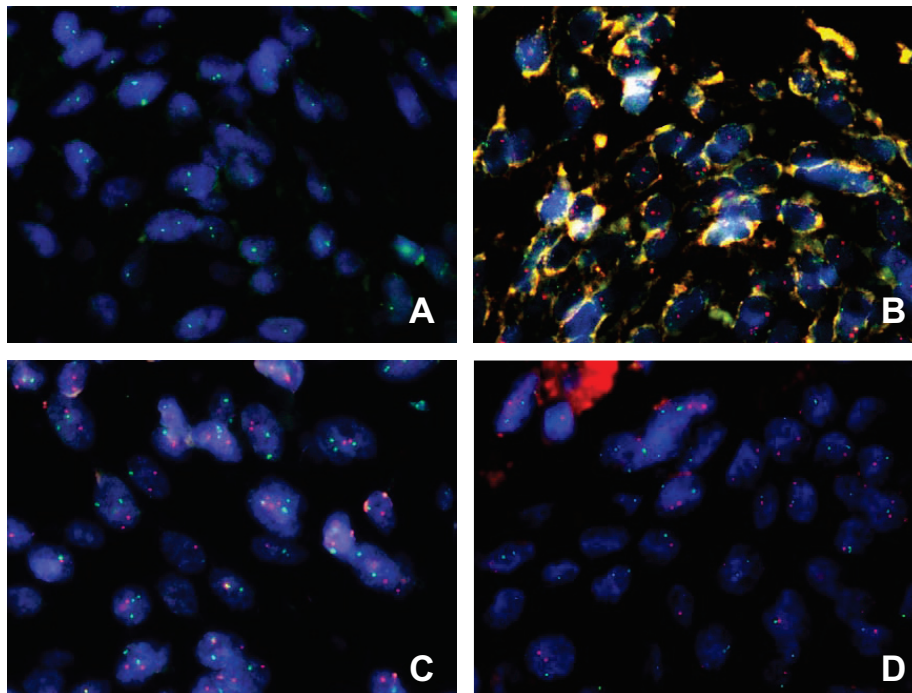


Figura 36. Hibridación “*in situ*” de fluorescencia en núcleos en interfase en los TMAs estudiados. A: se observa la ausencia de una señal en la mayoría de núcleos (monosomía del cromosoma 22, en verde). B: se observa la deleción del brazo corto del cromosoma 1 (en rojo el *locus* 1p36, en verde el *locus* 1q25). C y D muestran el *locus* 14q32 en verde y el *locus* de control (11q13) en rojo. C: caso con dotación normal para el cromosoma 14. D: Se aprecia la ausencia de señales verdes, lo que sugiere monosomía 14 (Imágenes a 100x).

4.1 Resultados de iFISH en meningiomas primarios

De los meningiomas primarios analizados (n=61), mostraron pérdidas en el cromosoma 22, 34 casos (55,7%), pérdidas en 1p36, 19 casos (31,1%) y pérdidas en 14q32, 14 casos (22,9%). Un 19 casos no presentaron alteración en ninguno de los cromosomas estudiados (31,1%). Los resultados de los estudios de iFISH se recogen en la tabla 15.

Tabla 15. Detalle de las alteraciones halladas por iFISH en meningiomas primarios

N	Caso	Grado	#22q11.2	#1p36	#14q32
1	1	1	normal	1p-	normal
2	2	1	normal	normal	normal
3	3	1	normal	normal	normal
4	5	2	22q-	1p-	normal
5	7	1	normal	normal	normal
6	11	1	normal	1p-	normal
7	12	1	22q-	normal	14q-
8	16	1	22q-	normal	normal
9	19	3	22q-	1p-	14q-
10	30	1	normal	1p-	normal
11	32	1	normal	normal	normal
12	34	1	22q-	normal	normal
13	35	1	22q-	normal	14q-
14	36	2	22q-	1p-	14q-
15	38	1	22q-	normal	normal
16	39**	2	normal	1p-	14q-
17	40	2	normal	normal	14q-
18	42	1	22q-	normal	normal
19	43	2	normal	normal	normal
20	44	1	normal	normal	normal
21	45	1	normal	normal	normal
22	47	1	22q-	1p-	normal
23	50	1	normal	normal	normal
24	51	1	22q-	1p-	14q-
25	53	1	normal	normal	normal
26	55	2	22q-	normal	14q-
27	61	1	22q-	normal	normal
28	63	1	22q-	normal	normal

N	Caso	Grado	#22q11.2	#1p36	#14q32
29	66	1	22q-	1p-	14q-
30	67	1	22q-	normal	normal
31	68	1	22q-	normal	normal
32	69	1	normal	normal	normal
33	70	1	22q-	normal	normal
34	71	2	22q-	normal	14q-
35	73	2	normal	normal	normal
36	74	1	22q-	normal	normal
37	75	1	22q-	normal	normal
38	76	1	normal	normal	normal
39	77	1	22q-	normal	14q-
40	78	1	22q-	normal	14q-
41	79	1	22q-	1p-	normal
42	80	1	normal	1p-	normal
43	81*	1	22q-	1p-	normal
44	82	2	normal	normal	14q-
45	84	1	normal	normal	normal
46	85	1	22q-	normal	normal
47	86	2	22q-	1p-	normal
48	87	1	22q-	normal	normal
49	88	1	22q-	normal	normal
50	89	1	normal	1p-	normal
51	90	1	22q-	1p-	14q-
52	91	1	22q-	normal	normal
53	92	1	22q-	1p-	normal
54	93	1	normal	normal	normal
55	94	2	normal	normal	normal
56	95	1	normal	normal	normal
57	96	1	normal	normal	normal
58	97	1	22q-	1p-	normal
59	98	1	normal	normal	normal
60	99	1	22q-	1p-	normal
61	101	1	normal	normal	normal

Se señalan con asterisco (*) los casos cuyas recidivas tumorales fueron estudiadas; el número de asteriscos representa el número de recidivas.

La distribución de las alteraciones en función del grado histológico en estos meningiomas primarios fue la siguiente:

- Los tumores primarios de grado I (n=49) presentaron pérdidas de material en 22q en 28 casos (57,1%), 14 casos presentaron pérdidas en 1p (28,6%) y 7 presentaron pérdidas en 14q (14,3%). Por último, 16 casos no mostraron alteraciones en ninguna de las regiones estudiadas (32,7%).

- Los tumores primarios de grado II (n= 12) mostraron pérdidas en 22q en 6 casos (50,0%), en 1p-, en 5 casos (41,7%) y en 14q, en 7 casos (58,3%). Hubo 3 casos sin alteraciones en estas regiones (25,0%).

La alteración del cromosoma 14 fue la única que se asoció significativamente con el grado histológico, alterado sólo en un 14,3%-de los meningiomas primarios de grado I, frente a un 58,3% de los de grado II (p=0,003) (figura 37A).

4.2 Resultados de iFISH en meningiomas recidivados

En las recidivas tumorales estudiadas por iFISH (n=9), hallamos pérdidas en 22q en 8 casos (88,9%), pérdidas en 1p en 4 casos (44,4%) y pérdidas en 14q en 4 casos (44,4%) (tabla 16).

Las alteraciones en función del grado histológico fueron:

- Recidivas de grado I (n=3): 2 casos mostraron pérdidas en 22q (33,3%), 2 casos mostraron pérdidas en 1p (33,3%). Cabe señalar que un caso no presentó alteraciones en ninguno de los cromosomas analizados.

- Recidivas de grados superiores (n=6): todos los casos presentaron pérdidas en los cromosomas 22 y 14 (100%), y 4 casos mostraron pérdidas en 1p (66,7%).

La alteración del cromosoma 14 fue la única que se asoció significativamente con el grado histológico, al mostrarse alterado en todas las recidivas de grados II y III y en ninguna de las de grado I (p=0,012) (figura 37B).

Tabla 16. Detalle de las alteraciones cromosómicas detectadas por iFISH en los meningiomas recidivados analizados

N	Caso	Grado	#22q11,2	#1p36	#14q32
1	17 (rec 1)	1	22q-	1p-	normal
2	20 (rec 1)	1	normal	normal	normal
3	29 (rec 1)	3	22q-	normal	14q-
4	39* (rec 1)	2	22q-	1p-	14q-
5	39* (rec 2)	2	22q-	1p-	14q-
6	56 (rec 1)	2	22q-	1p-	14q-
7	58 (rec 1)	3	22q-	1p-	14q-
8	65 (rec 1)	3	22q-	normal	14q-
9	81* (rec 1)	1	22q-	1p-	normal

rec 1, primera recidiva; rec 2, segunda recidiva; *, recidivas cuyos tumores primarios han sido estudiados por iFISH

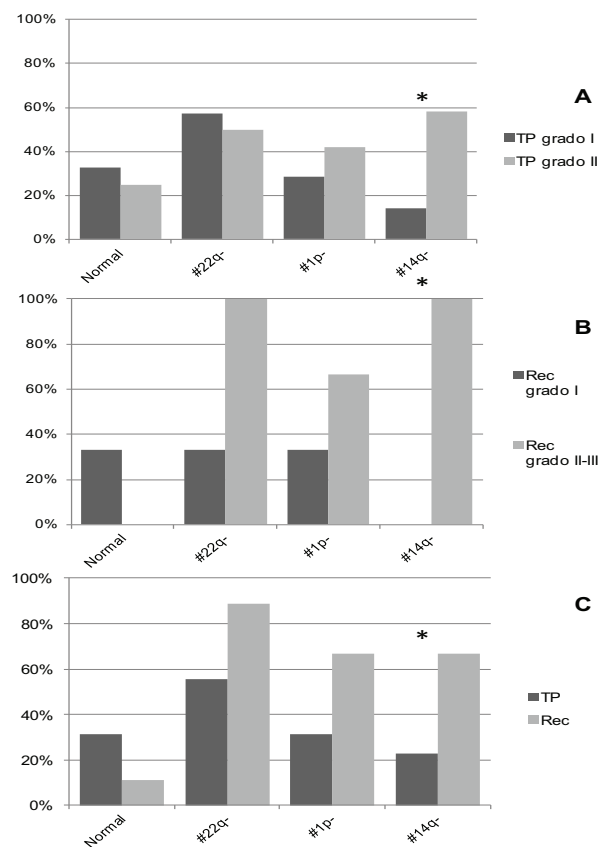


Figura 37. Porcentaje de alteraciones detectadas en los cromosomas 1, 14 y 22 mediante sondas de FISH. A-B: alteraciones en meningiomas en función del grado histológico. A: tumores primarios B: recidivas. C: alteraciones en tumores primarios frente a recidivas tumorales. Rec, recidiva; TP, tumor primario; *diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

5 Estudios moleculares: amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification: MLPA)

5.1 Estado alélico del gen *NF2* mediante MLPA

El análisis de *NF2* mediante MLPA posibilita el estudio simultáneo de los 17 exones del gen; así, esta técnica proporciona información sobre el estado alélico global del gen y, además, información concreta de las regiones que codifican los diferentes dominios de la proteína merlín. Para ello, en el estudio de *NF2* agrupamos las 2 regiones codificantes principales, para establecer las deleciones que afectaban al gen completo (deleción total) y las que lo afectaban parcialmente: al dominio de homología a las proteínas 4.1 (exones 2 a 8) o a la la región codificante del dominio α -hélice de la proteína (exones 10 a 15). De los 106 tumores analizados, el 65,1% presentó algún tipo de alteración en *NF2*; el 40,6% de las muestras presentó deleciones totales y el 24,5%, deleciones parciales. De ellos, 85 eran meningiomas primarios y 21 eran recidivas tumorales. Los resultados en cada grupo se detallan a continuación.

Se obtuvieron 4 tipos de perfiles de picos al relativizar frente a los controles, en función de si el gen estaba intacto, si hubo deleción total, o si hubo deleción parcial que afectara a la porción amino-terminal o a la carboxi-terminal. Estos perfiles se muestran en la figura 38, en casos representativos; se observa el patrón de picos en cada exón de *NF2* proporcionado con el análisis del software Coffalyser. Los resultados en el conjunto de muestras analizadas se recogen en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados del estudio de NF2 mediante MLPA

N	Caso	TP/R	NF2	Detalle	N	Caso	TP/R	NF2	Detalle	N	Caso	TP/R	NF2	Detalle
1	1	TP	normal	normal	41	31	TP	LOH	LOH R4.1	81	66	TP	LOH	LOH total
2	2	TP	normal	normal	42	32	TP	normal	normal	82	67	TP	LOH	LOH total
3	3	TP	normal	normal	43	33	TP	LOH	LOH total	83	68	TP	normal	normal
4	3	Rec	nd	nd	44	34	TP	LOH	LOH total	84	69	TP	normal	normal
5	4	Rec	LOH	LOH total	45	35	TP	LOH	LOH total	85	70	TP	normal	normal
6	5	TP	LOH	LOH R4.1	46	36	TP	LOH	LOH total	86	71	TP	LOH	LOH total
7	6	TP	LOH	LOH total	47	37	TP	LOH	LOH R4.1	87	72	TP	nd	nd
8	7	TP	normal	normal	48	38	TP	LOH	LOH total	88	72	Rec	nd	nd
9	8	Rec	LOH	LOH R4.1	49	39	TP	LOH	LOH R4.1	89	73	TP	normal	normal
10	9	Rec	LOH	LOH R4.1	51	39	Rec	LOH	LOH total	90	74	TP	LOH	LOH total
11	10	TP	LOH	LOH total	50	39	Rec	LOH	LOH R4.1	91	75	TP	LOH	LOH total
12	10	Rec	LOH	LOH total	52	40	TP	normal	normal	92	76	TP	normal	normal
13	11	TP	normal	normal	53	41	TP	LOH	LOH total	93	77	TP	LOH	LOH R4.1
14	12	TP	LOH	LOH reg alfa	54	42	TP	LOH	LOH reg alfa	94	78	TP	LOH	LOH total
15	13	TP	LOH	LOH R4.1	55	43	TP	normal	normal	95	79	TP	LOH	LOH total
16	13	Rec	LOH	LOH R4.1	56	44	TP	normal	normal	96	80	TP	normal	normal
18	13	Rec	LOH	LOH total	57	45	TP	normal	normal	97	81	TP	LOH	LOH total
17	13	Rec	LOH	LOH R4.1	58	46	TP	LOH	LOH total	98	81	Rec	LOH	LOH total
19	14	TP	nd	nd	59	47	TP	LOH	LOH R4.1	99	81	Rec	nd	nd
20	14	Rec	nd	nd	60	48	TP	LOH	LOH R4.1	100	82	TP	LOH	LOH total
21	15	Rec	normal	normal	61	49	TP	LOH	LOH R4.1	101	83	TP	LOH	LOH total
22	16	TP	LOH	LOH R4.1	62	50	TP	normal	normal	102	84	TP	LOH	LOH reg alfa
23	17	TP	LOH	LOH total	63	51	TP	normal	normal	103	85	TP	LOH	LOH total
24	17	Rec	LOH	LOH total	64	52	TP	LOH	LOH total	104	86	TP	LOH	LOH reg alfa
25	18	TP	normal	normal	65	53	TP	normal	normal	105	87	TP	LOH	LOH total
26	19	TP	LOH	LOH total	66	54	TP	normal	normal	106	88	TP	nd	nd
27	19	Rec	LOH	LOH total	67	55	TP	LOH	LOH total	107	89	TP	nd	nd
28	20	Rec	normal	normal	69	56	TP	normal	normal	108	90	TP	LOH	LOH total
29	21	TP	LOH	LOH total	68	56	Rec	LOH	LOH total	109	91	TP	LOH	LOH reg alfa
30	22	TP	LOH	LOH R4.1	70	57	TP	normal	normal	110	92	TP	LOH	LOH total
31	23	TP	nd	nd	71	58	Rec	LOH	LOH total	111	93	TP	normal	normal
32	23	Rec	normal	normal	72	59	Rec	LOH	LOH total	112	94	TP	normal	normal
33	24	TP	LOH	LOH total	73	60	TP	nd	nd	113	95	TP	normal	normal
34	25	Rec	normal	normal	74	60	Rec	nd	nd	114	96	TP	normal	normal
35	26	TP	normal	normal	75	61	TP	LOH	LOH R4.1	115	97	TP	LOH	LOH R4.1
36	27	TP	LOH	LOH R4.1	76	62	TP	LOH	LOH total	116	98	TP	normal	normal
37	28	TP	normal	normal	77	63	TP	normal	normal	117	99	TP	LOH	LOH R4.1
38	29	TP	LOH	LOH R4.1	78	63	Rec	nd	nd	118	100	TP	nd	nd
39	29	Rec	LOH	LOH total	79	64	TP	normal	normal	119	100	Rec	nd	nd
40	30	TP	LOH	LOH total	80	65	Rec	LOH	LOH total	120	101	TP	normal	normal

LOH, pérdida de heterocigosidad; nd, no disponible; Rec, recidiva; reg,

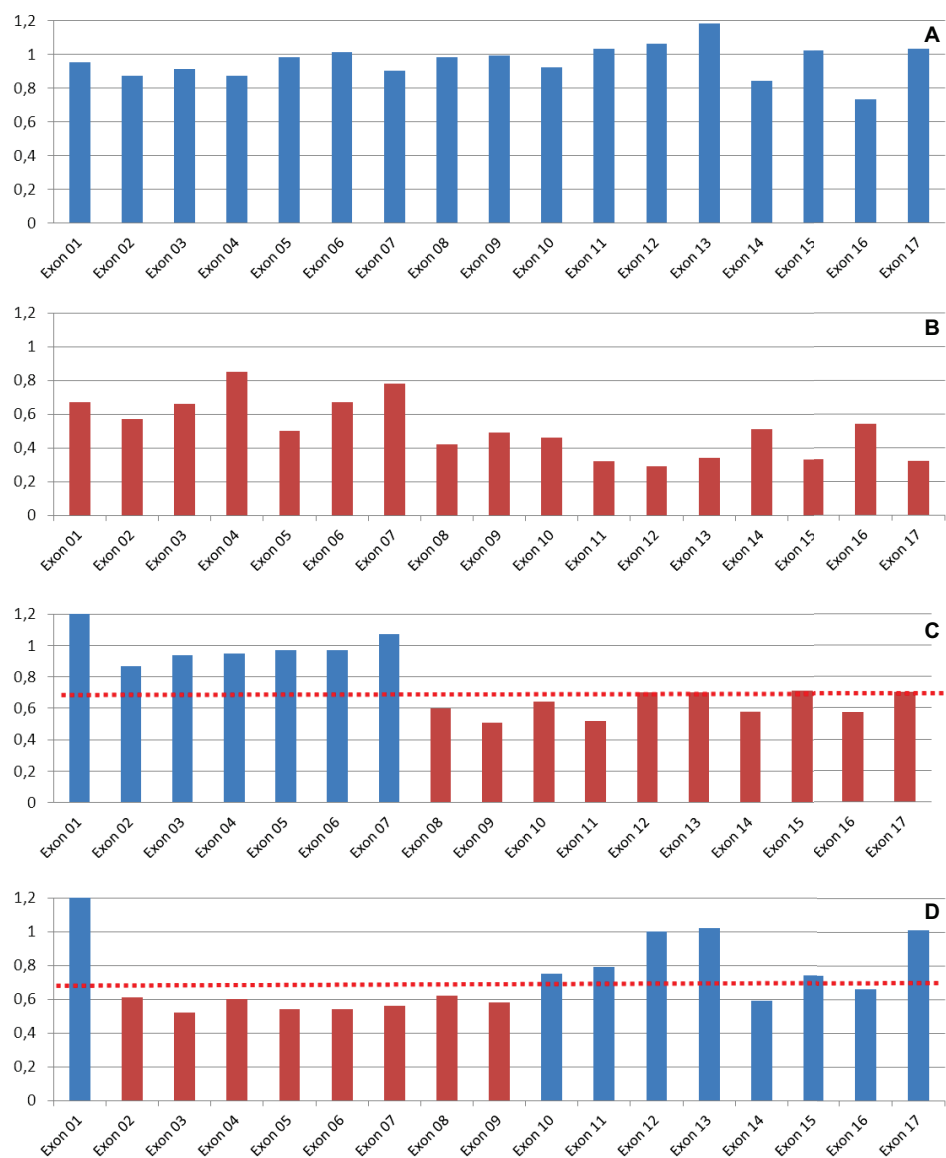


Figura 38. Se muestran los perfiles-tipo hallados en la serie de casos estudiados. A. Estado alélico normal del gen *NF2* en todos sus exones (caso 53). B, Estado alélico de delección total en heterocigosis del gen *NF2* (caso 6). C, Estado alélico de delección parcial, que afecta a la parte terminal del gen, a partir del exón 8 (caso 86). D. Estado alélico de delección parcial, que afecta a la parte inicial del gen *NF2* (caso 16). El exón 1 se presentó en la mayoría de los casos intacto. Las barras azules corresponden a valores relativos de normalidad; las barras rojas corresponden a señales relativas de delección. La línea discontinua señala el límite de la normalidad situado en 0,7 unidades relativas.

5.1.1 Análisis del gen *NF2* mediante MLPA en meningiomas primarios

En los tumores primarios (n= 85) encontramos el gen *NF2* en su estado alélico normal en 33 casos (38,8%), mientras que 52 casos mostraron deleciones en heterocigosis en este gen (61,2%). En ningún caso se detectaron pérdidas en homocigosis.

Al estudiar en detalle los distintos dominios de *NF2* por MLPA, hallamos que en los casos que mostraron deleción (n=52), ésta afectaba en 31 casos al gen completo (59,6%) y en 21 casos a una porción del gen (40,4%). Las deleciones parciales afectaron a la región de homología a proteínas 4.1 en 16 casos (76,2%) y al dominio α -hélice en 5 casos (23,8%).

Si se considera el grado histológico de los meningiomas primarios con respecto al estado alélico del gen *NF2*, de 64 meningiomas de grado I, 27 presentaban *NF2* normal (42,2%) y 37 presentaban deleciones totales o parciales (57,8%). En los 21 meningiomas de grado II-III estudiados, 6 conservaban las 2 copias de *NF2* intactas (28,6%) y 15 portaban deleciones (71,4%) (tabla 18).

Tabla 18. Distribución en función del grado, del estado alélico del gen *NF2* estudiado mediante MLPA en meningiomas primarios

	N	<i>NF2</i> delecionado	Deleción total	Deleción parcial
Grado I	64	37 (57,8%)	22 (59,5%)	15 (40,%)
Grado II	20	14 (70,0%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)
Grado III	1	1	1	0

A la vista de estos resultados se extrae que más de la mitad de los casos presentaron alteraciones en *NF2*, si bien la afectación del gen fue mayor, aunque no significativamente, en los tumores de grados superiores (70,0%) que en los de grado I (57,1%) (figura 39A). En los casos con deleciones en *NF2*, la distribución del tipo de deleción que presentaban los tumores de grado I (figura 39B) y los tumores de grados II y III (figura 39C) fue similar también.

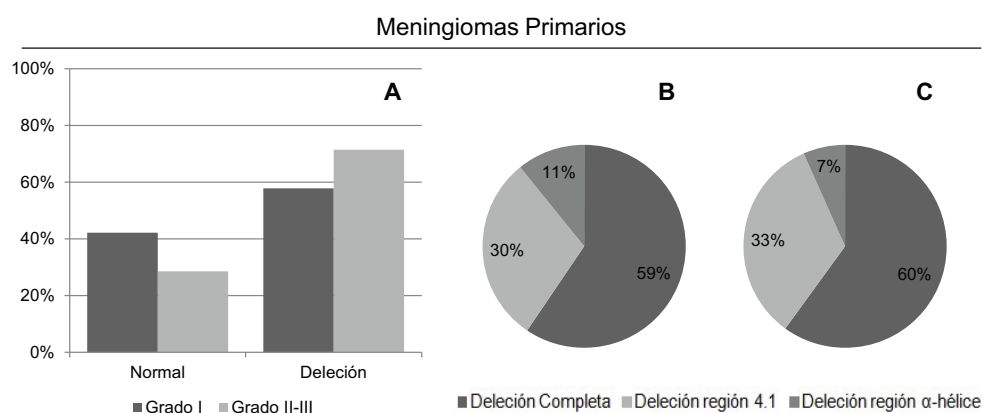


Figura 39. Estado del gen *NF2* en los meningiomas primarios. A: Presencia de deleciones en *NF2* en función del grado histológico. B-C: Los diagramas circulares expresan las proporciones relativas de los diferentes tipos de alteración detectados por MLPA en los tumores que presentaron delección. B: Meningiomas primarios grado I. C: Meningiomas primarios grado II-III.

5.1.2 Análisis del gen *NF2* mediante MLPA en meningiomas recidivados

En las 21 recidivas tumorales que se incluyen en este estudio, encontramos el gen *NF2* normal en 4 casos (19,1%), y delecionado en heterocigosis en 17 casos (80,9%). No se detectaron deleciones homocigóticas en los meningiomas recidivados. Las deleciones afectaban a todos los exones del gen, en 12 de los 17 casos (70,6%) y fueron deleciones parciales del dominio de homología a proteínas 4.1 en 5 casos (29,4%).

La delección en *NF2* se relacionó con el grado histológico, siendo más patente en las recidivas de grado II y III ($p=0,032$). La distribución de las alteraciones en *NF2* en función del grado histológico en los meningiomas recidivados se recoge en la tabla 19, y las proporciones relativas de cada uno de los tipos de delección hallados se muestran en la figura 40.

Tabla 19. Distribución en función del grado del estado alélico del gen *NF2* estudiado mediante MLPA en recidivas de meningioma.

	N	<i>NF2</i> delecionado	Delección Total	Delección Parcial
Grado I	6	3 (50,0%)	3(100,0%)	0
Grado II	5	4 (80,0%)	2 (50,0%)	2(50,0%)
Grado III	10	10 (100%)	7 (70,0%)	3 (30,0%)

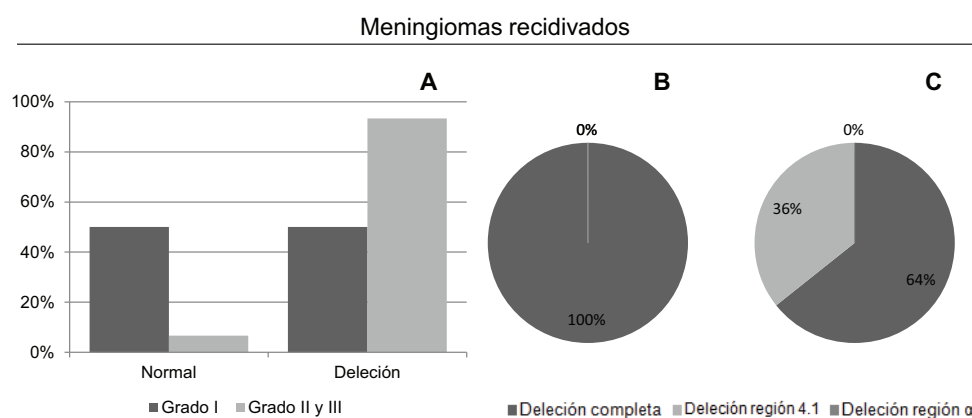


Figura 40. Estado del gen *NF2* en los meningiomas recidivados. A: Estado de *NF2* en función del grado histológico. B-C: Los diagramas circulares expresan las proporciones relativas de los diferentes tipos de alteración detectados por MLPA en los tumores que presentaron delección. B: recidivas de grado I. C: recidivas de grados II-III.

5.2 Estudio comparativo de los hallazgos en el estado alélico del gen *NF2* por MLPA y la determinación de la región 22q por técnicas citogenéticas

En 106 casos se estudió el estado del cromosoma 22 mediante técnicas citogenéticas, clásica y/o molecular (en función de la disponibilidad de las muestras) y el estado alélico del gen *NF2* por MLPA. Hemos analizado los hallazgos obtenidos mediante ambas técnicas. Las técnicas citogenéticas en conjunto pusieron de manifiesto las monosomías totales o parciales del cromosoma 22 en 58 casos (54,7%) y un estado cromosómico normal en 48 casos (45,3%); en este grupo de muestras, mediante MLPA observamos deleciones del gen *NF2* en 69 casos (65,1%) y un estado alélico normal en 37 casos (34,9%). Las determinaciones mediante ambos tipos de técnicas, así como su concordancia se resumen en la tabla 20.

Tabla 20. Estudio de la concordancia entre las observaciones hechas mediante técnicas citogenéticas (cariotipo e iFISH) y técnicas moleculares (MLPA).

		Citogenética		Total casos
		Normal (48)	Delección (58)	
MLPA	Normal (37)	33	4	37
	Delección (69)	15	54	69
Total casos		48	58	106

La concordancia en los casos con un estado normal de la región estudiada del gen *NF2* fue del 89,2%, y en los casos en los que se presentaban deleciones fue del 78,2%. En conjunto, proporcionaron un índice Kappa de Cohen de 0,648 entre los dos tipos de observaciones, lo que implica una buena correlación entre las técnicas. Por otro lado, 4 casos mostraron pérdidas de material genético en el cromosoma 22 mediante citogenética que no pudieron ser detectadas por MLPA (3,8% de los casos). Si ajustamos el índice de concordancia a las discrepancias por déficit de sensibilidad, obtenemos un índice kappa de Cohen de 0,907, lo que implica un acuerdo excelente entre ambas técnicas.

5.3 Análisis de otros *loci* cromosómicos en el estudio P044-*NF2*: 1p34, 2q13, 3p22, 4q27, 14q13 y 15q21

El estudio por MLPA de los exones del gen *NF2* utilizando el kit P044 incluye una batería de sondas que asciende a 14 regiones cromosómicas adicionales. De los resultados obtenidos, cabe resaltar que se detectaron anomalías en los *loci* 1p34, 2q13, 3p22, 4q27 y 15q21, fundamentalmente en forma de deleciones heterocigóticas. En la tabla 21 y la figura 41 se recogen los resultados hallados.

Tabla 21. Resumen de las deleciones en heterocigosis en diferentes *loci* cromosómicos

Deleción	TP	Recidivas	TP I	TP II-III	Rec I	Rec II-III
1p34	20,0%	66,7%	15,9%	33,3%	33,3%	80,0%
2q13	10,6%	4,8%	14,3%	0,0%	16,7%	0,0%
3p22	40,0%	38,1%	46,0%	23,8%	66,7%	26,7%
4q27	40,0%	57,1%	42,9%	33,3%	33,3%	66,7%
14q13	17,6%	38,1%	11,1%	38,1%	16,7%	46,7%
15q21	48,2%	52,4%	46,0%	57,1%	33,3%	60,0%

TP, tumor primario; Rec, recidiva. En números romanos se indica el grado de los tumores. Se señalan en negrita los valores que mostraron diferencias significativas.

El **locus 1p34** presentó deleciones en 17 meningiomas primarios (20,0%) y 14 recidivas (66,7%), lo que supone una incidencia 3,3 veces superior en las recidivas ($p < 0,001$) (figura 41A). Además, en las recidivas fue más frecuente la deleción en hombres (84,6%) que en mujeres (37,5%) ($p = 0,041$). Cuando analizamos esta deleción en función del grado, la hallamos en 10 tumores primarios de grado I (15,9%) y en 7 de grados superiores (33,3%). En las recidivas tumorales, la hallamos en 2 de grado I (33,3%) y 12 de grados superiores (80%), de manera que este *locus*, además de mostrarse más delecionado en recidivas, se presentó más afectado en meningiomas de grados II-III, tanto primarios -con una incidencia 2,1 veces superior ($p = 0,081$)- como en recidivas, con una incidencia 2,4 veces superior ($p = 0,064$) frente a sus homólogos de grado I; estas diferencias no fueron significativas.

El **locus 2q13** se encontró delecionado en 9 tumores primarios (10,6%) y una sola recidiva (4,8%). Cuando analizamos esta deleción en función del grado, hallamos que todos los tumores que la presentaban eran de grado I, siendo 9 tumores primarios (14,3%) y 1 recidiva tumoral (16,7%) ($p = 0,067$). Ningún tumor de grado II o III mostró deleción en este *locus*.

El **locus 3p22** se presentó delecionado en 34 meningiomas primarios (40,0%) y 8 recidivas tumorales (38,1%). En los distintos grados histológicos, la hallamos en 29 tumores primarios de grado I (46,0%) y en 5 de grados superiores (23,8%); en los meningiomas recidivados, la detectamos en 4 de grado I (66,7%) y en 4 de grados superiores (26,7%). Así, si bien no mostró diferencias significativas entre tumores primarios y recidivas, la incidencia en meningiomas primarios de grado I fue 1,9 veces superior a los de grados II y III ($p = 0,066$), y en las recidivas de grado I fue 2,5 veces superior la frecuencia de deleción, frente a las recidivas de grados superiores ($p = 0,088$).

El **locus 4q27** estaba delecionado en heterocigosis en 34 meningiomas primarios (40,0%) y 12 recidivas (57,1%). Cuando analizamos esta deleción en función del grado, la hallamos en 27 tumores primarios de grado I (42,9%) y en 7 de grados superiores (33,3%) lo que supone una incidencia 1,3 veces superior en los meningiomas de grado I que en los de grados superiores. En las recidivas tumorales, la hallamos en 2 de grado I (33,3%) y en 10 de grados superiores (66,7%), por lo que fue casi 3 veces más frecuente su afectación que en las recidivas de grado I; no obstante, esta diferencia tampoco fue significativa.

El **locus 14q13** mostró deleciones en 15 meningiomas primarios (17,6%) y en 8 recidivas (38,1%) ($p=0,041$). La distribución en función del grado fue de 7 tumores primarios de grado I (11,1%) y 8 tumores primarios de grados superiores (38,1%); este *locus* se halló significativamente más afectado en los tumores primarios de grados superiores ($p=0,016$) (figura 41B). En las recidivas tumorales, la hallamos en una de grado I (16,7%) y en 7 de grados superiores (46,7%) aunque esta diferencia no fue significativa (figura 41C).

El **locus 15q21** estuvo delecionado en 41 meningiomas primarios (48,2%) y en 11 recidivas (52,4%). Al analizar los distintos grados histológicos de los tumores, hallamos deleción en 29 tumores primarios de grado I (46,0%) y en 12 tumores primarios de grados superiores (57,1%). En las recidivas tumorales, detectamos esta deleción en 2 de grado I (33,3%) y en 9 de grados superiores (60,0%). Las deleciones en este *locus* mostraron diferencias en función del grado en las recidivas tumorales, con una incidencia 1,8 veces superior en las recidivas de grados II-III frente a las de grado I, aunque estas diferencias no fueron significativas (tabla 21).

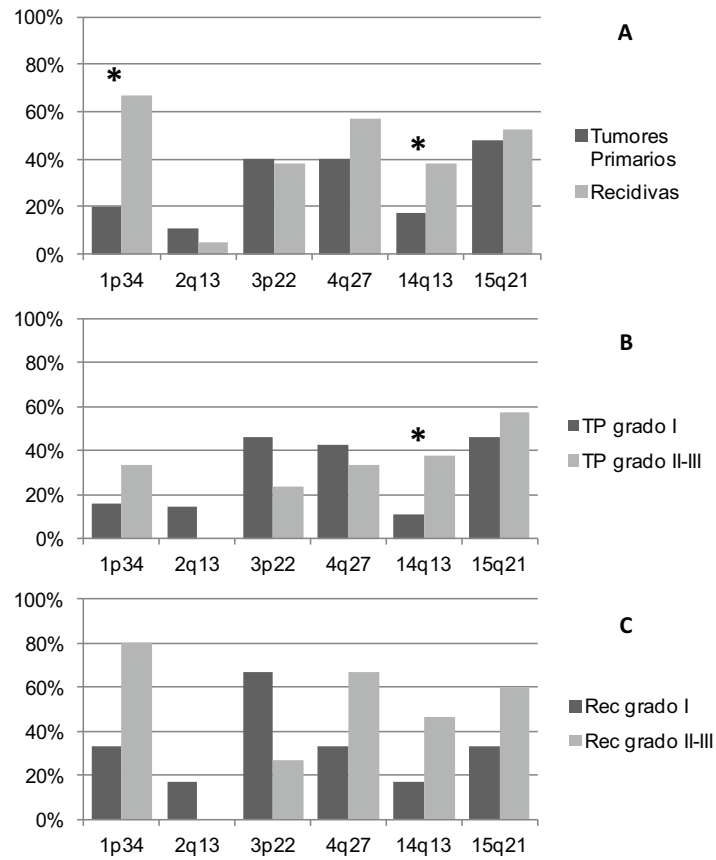


Figura 41. Deleciones en heterocigosis detectadas en diferentes *loci* cromosómicos mediante MLPA (kit NF2 P044-B1). A: comparación de tumores primarios frente a recidivas. Obsérvese la mayor presencia de deleciones en 1p34 ($p < 0,001$) y en 14q13 ($p = 0,041$) en las recidivas tumorales. B: comparación en meningiomas primarios de grado I frente a los de grados II y III. C: comparación en recidivas de grado I frente a recidivas de grados II y III. Rec, recidivas; TP, tumores primarios. *, diferencias estadísticamente significativas.

6 Estudios moleculares: amplificación de sondas múltiples dependiente de ligación para metilación específica (MS-MLPA)

Con los ácidos nucleicos extraídos a partir de las muestras incluidas en parafina, estudiamos la variación en número de copias (VNC) y el estado de metilación de un conjunto de 24 genes supresores de tumor y 14 genes adicionales presentes en el kit ME001-C2 (MRC-Holland).

Se estudiaron un total de 120 meningiomas, 92 eran meningiomas primarios y 28 recidivas tumorales. De los 92 tumores primarios, 70 eran tumores de grado I o benignos, 21 eran tumores de grado II o atípicos y únicamente uno era de grado III o anaplásico. En los 28 meningiomas recidivados que presentamos, se incluyen 10 tumores de grado I, 8 tumores de grado II y 10 tumores de grado III.

Encontramos pérdidas alélicas en 32 de los 38 genes en que estudiamos las VNC; los genes que no presentaron deleciones en ningún caso fueron *ATM*, *IGSF4*, *CDKN1B*, *BRCA2*, *BRCA1* y *TNRSF1A*.

De los 24 genes supresores de tumor cuyo estado de metilación analizamos, detectamos hipermetilación en 21 genes; los genes *RARB*, *CDKN1B* y *CHFR* mostraron un estado de metilación normal en todos los casos.

La tabla 22 recoge los resultados hallados en cuanto a VNC y a estado de metilación de los genes supresores de tumor analizados y la VNC de los genes implicados en neoplasias, en las 120 muestras analizadas. En conjunto en toda la serie, los genes supresores de tumor que con más frecuencia sufrieron LOH fueron, por orden de frecuencia, *TP73* (45,0%), *ESR1* (43,3%), *CDH13* (36,7%), *TIMP3* (25,8%), *HIC1* (20,0%) y *DAPK1* (15,8%). Además mostraron LOH frecuente los genes adicionales *PARK2* (45,8%), *CELF2* (36,7%), *BCL2* (33,3%), *PAH* (25,0%), *TSC2* (19,2%), *CTNNB1* (18,3%) y *MLH3* (15,3%). Con respecto a la hipermetilación, afectó principalmente en esta serie, en su conjunto a *GSTP1* (25%), *CDH13* (23,3%), *RASSF1* (18,3%), *TP73* (15,0%), *CDKN2A* (14,2%), *CDKN2B* (14,2%), *MLH1* (10,8%), *PTEN* (10,8%) y *ESR1* (9,2%).

Tabla 22. Variación en número de copias (VNC) y estado de metilación de los genes analizados en 120 meningiomas procedentes de 101 pacientes. Se indican en rojo las deleciones en homocigosis y en naranja las deleciones en heterocigosis. La presencia de hipermetilación se representa "M".

Caso	Muestra	TP73	CASP8	VHL	RARB	MLH1	RASSF1	FHIT	APC	ESR1	CDKN2A	CDKN2B	DAPK1	PTEN	CD44	IGSTP1	ATM	IGSF4	CDKN1B	CHFR	BRCA2	CDH13	HIC1	BRCA1	TIMP3	CTNNB1	CASR	PARK2	GDK6	CREM	CELF2	TNFRSF1A	CD27	PAH	MLH3	TSC2	GDH1	BCL2	KLK3					
1	TP	M																																										
2	TP	M																																										
3	TP																																											
3	Rec1																																											
4	Rec1																M																											
5	TP																																											
6	TP						M																																					
7	TP	M																																										
8	Rec1	M	M						M	M	M	M					M						M			M																		
9	Rec1	M					M										M	M					M	M	M																			
10	TP																																											
10	Rec1																																											
11	TP																																											
12	TP																																											
13	TP	M					M																																					
13	Rec1																																											
13	Rec2																																											
13	Rec3																																											
14	TP					M																																						
14	Rec1	M				M					M		M											M	M		M																	
15	Rec1		M			M				M																																		
16	TP						M																																					
17	TP																																											
17	Rec1						M				M																																	
18	TP																																											
19	TP																																											
19	Rec1						M																																					
20	Rec1	M									M																																	
21	TP									M																																		
22	TP																																											
23	TP	M					M	M																																				
23	Rec1																																											
24	TP																																											
25	Rec1	M																																										
26	TP																																											
27	TP																																											
28	TP	M																																										
29	TP																																											
29	Rec1	M																																										
30	TP																																											
31	TP	M																																										
32	TP																																											
33	TP																																											
34	TP																																											
35	TP	M							M																																			

Resultados

Caso	Muestra	TP73	CASP8	VHL	RARB	MLH1	RASSF1	FHIT	APC	ESR1	CDKN2A	CDKN2B	DAPK1	PTEN	CD44	GSTP1	ATM	IGSF4	CDKN1B	CHFR	BRCA2	CDH13	HIC1	BRCA1	TIMP3	CTNNB1	CASR	PARK2	CDK6	CREM	CELF2	TNFRSF1A	CD27	PAH	MLH3	TSC2	CDH1	BCL2	KLK3			
36	TP																																									
37	TP																																									
38	TP																																									
39	TP																																									
39	Rec1						M																																			
39	Rec2						M				M			M																												
40	TP	M		M																																						
41	TP																																									
42	TP																																									
43	TP							M																																		
44	TP										M			M		M																										
45	TP																																									
46	TP	M																																								
47	TP																																									
48	TP																																									
49	TP										M																															
50	TP																																									
51	TP									M	M																															
52	TP																																									
53	TP																																									
54	TP						M																																			
55	TP										M																															
56	TP								M																																	
56	Rec1	M				M	M			M	M			M		M								M	M																	
57	TP																																									
58	Rec2									M																																
59	Rec1																																									
60	TP	M					M					M																														
60	Rec2											M																														
61	TP																																									
62	TP																																									
63	TP										M																															
63	Rec1																																									
64	TP		M				M																																			
65	Rec1						M																																			
66	TP																																									
67	TP	M																																								
68	TP																																									
69	TP																																									
70	TP						M																																			
71	TP																																									
72	TP																																									
72	Rec1																																									
73	TP																																									
74	TP	M									M																															
74	Rec1																																									
75	TP																																									
76	TP										M																															
77	TP																																									
78	TP																																									
79	TP																																									
80	TP																																									

Caso	Muestra	TP73	CASP8	VHL	RARB	MLH1	RASSF1	FHIT	APC	ESR1	CDKN2A	CDKN2B	DAPK1	PTEN	CD44	GSTP1	ATM	IGSF4	CDKN1B	CHFR	BRCA2	CDH13	HIC1	BRCA1	TIMP3	CTNNT1	CASR	PARK2	CDK6	CREM	CELF2	TNFRSF1A	CD27	PAH	MLH3	TSC2	CDH1	BCL2	KLK3						
81	TP																																												
81	Rec1						M																M																						
81	Rec2						M					M																																	
82	TP																M																												
83	TP					M					M			M																															
84	TP																							M																					
85	TP																						M																						
86	TP						M										M																												
87	TP																																												
88	TP																																												
89	TP																M																												
90	TP																							M																					
91	TP										M							M									M																		
92	TP	M				M	M		M	M	M	M		M	M	M	M					M	M	M			M																		
93	TP					M	M				M																																		
94	TP																																												
95	TP						M																																						
96	TP																																												
97	TP																																												
98	TP																																												
99	TP																																												
100	TP					M																																							
100	Rec1																																												
101	TP																																												

M, metilación; TP, tumor primario; Rec, recidiva.

6.1 Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en meningiomas primarios

En los 92 meningiomas primarios analizados, 85 casos presentaron deleciones en al menos 1 de los genes estudiados (92,4%) frente a 7 casos que no presentaron ninguna VNC (7,6%). Con respecto al estudio del estado de metilación de TSG, 63 casos presentaron hipermetilación en al menos uno de los genes estudiados (68,5%) frente a 29 con un estado de metilación normal (31,5%). El grado de afectación de los tumores primarios fue:

- Pérdidas alélicas en 1 a 3 genes: 23 casos (25%)
- Pérdidas alélicas en 4 a 6 genes: 34 casos (36,9%)
- Más de 6 genes afectados de pérdidas: 28 casos (30,4%)

- Hipermetilación en 1-3 genes: 63 casos (68,5%)
- Hipermetilación en 4-6 genes: 4 casos (4,3%)
- Hipermetilación en más de 6 genes: 1 caso (1,1%)

Los genes que mostraron mayores tasas de delección en heterocigosis fueron *PARK2*, en un 48,9% de los tumores primarios, seguido de *TP73*, *ESR1*, *CDH13*, *CELF2*, *BCL2* y *PAH*, todos ellos con afectación en más del 20% de los casos.

Encontramos deleciones en homocigosis en el 42,9% de las pérdidas de *MLH1* (3/7), el 40% de las deleciones en *TP73* (16/40), el 17,9% de las de *ESR1* (7/39), el 9,1% de las pérdidas en *CELF2* (3/30), el 8,3% de las pérdidas en *DAPK1* (1/12), el 6,1% de las pérdidas en *CDH13* (2/31), el 7,7% de las de *HIC1* (1/12), el 5,6% de las pérdidas en *TIMP3* (1/7) y el 4,4% de las pérdidas en *PARK2* (2/42). En el resto de genes todas las deleciones detectadas fueron en heterocigosis.

Con respecto al estado de metilación en los meningiomas primarios, la hipermetilación más frecuente se detectó en *GSTP1*, en un 22,8% de los casos, y en *CDH13* en un 20,7% de los casos. Entre un 5 y un 15% de los casos tenían hipermetilación (por orden de frecuencia) en *TP73*, *CDKN2A*, *RASSF1A*, *MLH1*, *CDKN2B*, *PTEN* y *ESR1*. De manera esporádica detectamos hipermetilación en *TIMP3*, *APC*, *HIC1*, *ATM*, *CASP8*, *BRCA2*, *VHL*, *CD44* y *FHIT*, que se mostraron alterados en 1-2 casos cada uno. Estos resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Variaciones en el número de copias y en el estado de metilación de los genes analizados en 92 meningiomas primarios

Genes	Locus	Delección	Del. Het	Del. Hom	Metilación
TP73	01p36	41 (44,5%)	25	16	12 (13,0%)
CASP8	02q33-q34	11 (12,0%)	11	0	1
VHL	03p26-p25	9 (9,8%)	9	0	1
RARB	03p24	2 (2,2%)	2	0	0
MLH1	03p21.3	7 (7,6%)	4	3	10 (10,9%)
RASSF1	03p21.3	7 (7,6%)	7	0	12 (13,0%)
FHIT	03p14.2	7 (7,6%)	7	0	1
APC	05q21	9 (9,8%)	9	0	2 (2,2%)
ESR1	06q25.1	40 (43,5%)	33	7	5 (5,4%)
CDKN2A	09p21	9 (9,8%)	9	0	12 (13,0%)
CDKN2B	09p21	4 (4,3%)	4	0	10 (10,9%)
DAPK1	09q34.1	13 (14,1%)	12	1	0
PTEN	10q23.31	0	0	0	9 (9,8%)
CD44	11p13	12 (13,0%)	12	0	1 (1,1%)
GSTP1	11q13	8 (8,7%)	8	0	21 (22,8%)
ATM	11q22.3	0	0	0	1 (1,1%)
IGSF4	11q23	0	0	0	0
CDKN1B	12p13.1	0	0	0	0
CHFR	12q24.33	1 (1,1%)	1	0	0
BRCA2	13q12	0	0	0	1 (1,1%)
CDH13	16q24.2	34 (36,9%)	32	2	19 (20,7%)
HIC1	17p13.3	14 (15,2%)	13	1	2 (2,2%)
BRCA1	17q21	0	0	0	0
TIMP3	22q12.3	19 (20,6%)	18	1	2 (2,2%)
CTNNB1	03p22	17 (18,5%)	17	0	-
CASR	03q13.3-q21	14 (15,2%)	14	0	-
PARK2	06q25.2-q27	45 (48,9%)	43	2	-
CDK6	07q21.3	2 (2,2%)	2	0	-
CREM	10p12.1	6 (6,5%)	6	0	-
CELF2	10p14	33 (35,9%)	30	3	-
TNFRSF1A	12p13	0	0	0	-
CD27	12p13	4 (4,3%)	4	0	-
PAH	12q23	24 (26,1%)	24	0	-
MLH3	14q24.3	14 (15,2%)	14	0	-
TSC2	16p13.3	15 (16,3%)	15	0	-
CDH1	16q22.1	2 (2,2%)	2	0	-
BCL2	18q21.3	26 (28,3%)	26	0	-
KLK3	19q13	19 (20,6%)	19	0	-

Del. Het, Delecciones en heterocigosis; Del. Hom, Delecciones en homocigosis; (-), sin sonda para el estudio de hipermetilación

6.1.1 Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en meningiomas primarios en función del grado histológico

Si analizamos de forma global el número de genes afectados, no hubo diferencias significativas entre los distintos grados histológicos, con una media de 5,0 y 5,2 LOH por tumor en grado I y grados superiores, respectivamente (figura 42).

Los genes *ESR1* y *PARK2* fueron los que con más frecuencia se encontraron delecionados en meningiomas primarios, independientemente del grado histológico.

Con respecto a las pérdidas de heterocigosidad en los tumores de grado I, sí que fueron significativamente más frecuentes que en los de grados superiores, aquellas que afectaron a *CDH13* (41,4% en grado I frente a 18,2% en grado II, $p=0,039$). Los genes *TP73* y *TSC2* estaban aparentemente más delecionados en los tumores de grado I pero la diferencia no fue significativa ($p=0,064$ y $p=0,076$, respectivamente). Las deleciones en *RASSF1*, *FHIT* y *GSTP1*, si bien no muy frecuentes, fueron exclusivas de meningiomas de grado I.

Cabe señalar que las deleciones en *TP73* en meningiomas de grado I fueron las únicas que se presentaron frecuentemente en homocigosis (55,9%). También detectamos este tipo de pérdidas en *ESR1* en 7 casos, y en casos únicos en los genes *MLH1*, *DAPK1*, *CDH13* y *TIMP3*.

En los meningiomas primarios de grado II, la proporción de casos afectados fue mayor que en los de grado I para los genes *CTNNB1* (12,8% frente a 36,4%, $p=0,019$), *PARK2* (42,9% frente a 68,2%, $p=0,033$), *CREM* (2,9% frente a 18,2%, $p=0,027$), *PAH* (20,0% frente a 45,5%, $p=0,021$) y *MLH3* (8,6% frente a 36,4%, $p=0,004$). La deleción en *CDK6* se detectó únicamente en 2 meningiomas de grado II ($p=0,055$). Entre 1 y 3 casos mostraron deleciones en homocigosis en *TP73*, *CDH13*, *HIC1*, *PARK2* y *CELF2* (figura 42A).

Con respecto a la hipermetilación en genes supresores de tumor, fue homogénea entre los distintos grados, con una media de 1,4 y 1,2 genes afectados por tumor en grado I y grados superiores, respectivamente. La única diferencia estadísticamente significativa la detectamos en la hipermetilación de *MLH1*, presente en un 14,3% de los tumores primarios de grado I y en ningún tumor de grados superiores ($p=0,050$). La

incidencia de algunas alteraciones, como *RASSF1*, y *CDKN2B* parecían superiores en tumores de grado II, aunque no se alcanzó significancia en estos hallazgos (figura 42B).

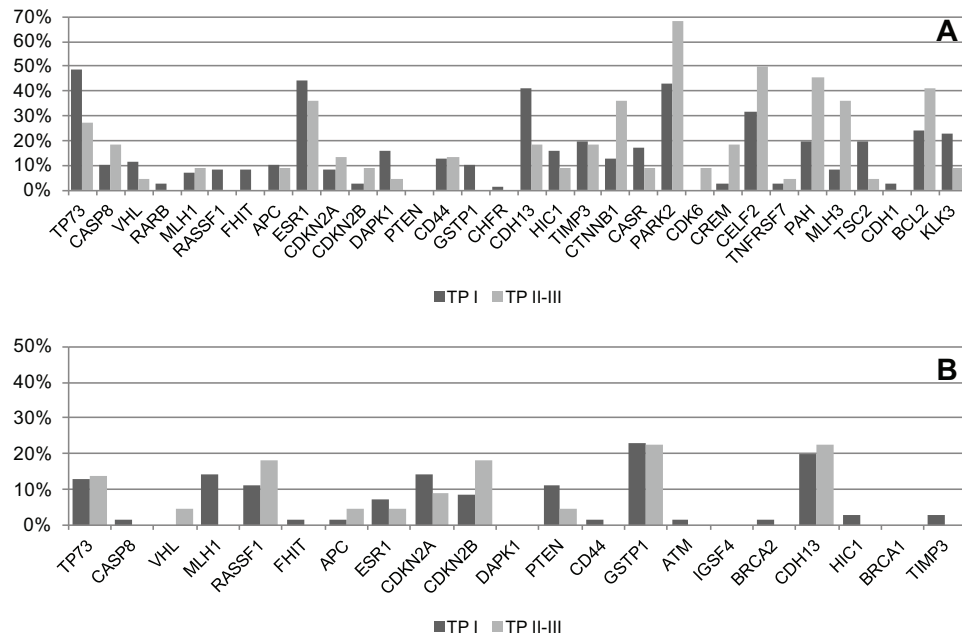


Figura 42. Alteraciones genéticas en cuanto a número de copias y estado de metilación, en meningiomas primarios, en función del grado histológico de los tumores. A: Deleciones detectadas; B: Hipermetilación en genes supresores de tumor. TP, tumor primario.

6.2 Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en recidivas

Los 28 meningiomas recidivados presentaron delección en alguno de los genes estudiados (100%). El patrón de metilación fue aberrante para 1 o más de los genes analizados en 23 casos (82,1%), frente a 5 casos en los que fue completamente normal (17,9%). El grado de afectación de las recidivas de meningioma fue:

- Pérdidas alélicas en 1 a 3 genes: 6 casos (21,4%)
- Pérdidas alélicas en 4 a 6 genes: 8 casos (28,5%)
- Más de 6 genes afectados de pérdidas: 14 casos (50,0%)
- Hipermetilación en 1-3 genes: 17 (60,7%)
- Hipermetilación en 4-6 genes: 2 (7,1%)
- Hipermetilación en más de 6 genes: 4 (14,3%)

En las recidivas, el gen que más frecuentemente se detectó alterado fue *BCL2*, en un 50% de los casos (todos ellos en heterocigosis), seguido de *TP73*, *ESR1*, *TIMP3*, *CELF2*, *CDH13*, *HIC1*, *PARK2*, *BRCA2*, *CDKN2B*, *TSC2*, *CDKN2A* y *DAPK1*.

Las pérdidas fueron en homocigosis para los genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *ESR1* y *TP73* en 5 casos cada uno, en 2 casos cada uno para *CDH13*, *HIC1* y *TIMP3*, y en un solo caso para *PARK2*.

Con respecto a la hipermetilación en los genes supresores de tumor, la hallamos en los genes *RASSF1* (35,7%), *GSTP1* y *CDH13* (32,1% cada uno de ellos), *CDKN2B* (25,0%), *TP73* y *ESR1* (21,4% cada uno de ellos), *CDKN2A* (17,9%), *PTEN* (14,3%), *MLH1* (10,7%) y en menos del 10% de los casos en *HIC1*, *TIMP3*, *ATM*, *IGSF4*, *DAPK1*, *CASP8*, *APC*, y *VHL* (tabla 24).

Tabla 24. Variaciones detectadas en 28 recidivas de meningioma, del número de copias y del estado de metilación de genes implicados en la biología tumoral.

Genes	Locus	Delección	Del. Het	Del. Hom	Metilación
<i>TP73</i>	01p36	13 (46,4%)	8	5	6 (21,4%)
<i>CASP8</i>	02q33-q34	5 (17,9%)	5	0	1 (3,6%)
<i>VHL</i>	03p26-p25	1 (3,6%)	1	0	1 (3,6%)
<i>RARB</i>	03p24	0	0	0	0
<i>MLH1</i>	03p21.3	1 (3,6%)	1	0	3 (10,7%)
<i>RASSF1</i>	03p21.3	3 (10,7%)	3	0	10 (35,7%)
<i>FHIT</i>	03p14.2	2 (7,1%)	2	0	0
<i>APC</i>	05q21	3 (10,7%)	3	0	1 (3,6%)
<i>ESR1</i>	06q25.1	12 (42,9%)	7	5	6 (21,4%)
<i>CDKN2A</i>	09p21	7 (25,0%)	2	5	5 (17,9%)
<i>CDKN2B</i>	09p21	8 (28,6%)	3	5	7 (25,0%)
<i>DAPK1</i>	09q34.1	6 (21,4%)	6	0	1 (3,6%)
<i>PTEN</i>	10q23.31	4 (14,3%)	4	0	4 (14,3%)
<i>CD44</i>	11p13	4 (14,3%)	4	0	0
<i>GSTP1</i>	11q13	2 (7,1%)	2	0	9 (32,1%)
<i>ATM</i>	11q22.3	0	0	0	1 (3,6%)
<i>IGSF4</i>	11q23	0	0	0	1 (3,6%)
<i>CDKN1B</i>	12p13.1	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	12q24.33	1 (3,6%)	1	0	0
<i>BRCA2</i>	13q12	0	0	0	0
<i>CDH13</i>	16q24.2	10 (35,7%)	8	2	9 (32,1%)
<i>HIC1</i>	17p13.3	10 (35,7%)	8	2	3 (10,7%)
<i>BRCA1</i>	17q21	0	0	0	1 (3,6%)
<i>TIMP3</i>	22q12.3	12 (42,9%)	10	2	3 (10,7%)
<i>CTNNB1</i>	03p22	5 (17,9%)	5	0	-
<i>CASR</i>	03q13.3-q21	4 (14,3%)	4	0	-
<i>PARK2</i>	06q25.2-q27	10 (35,7%)	9	1	-
<i>CDK6</i>	07q21.3	0	0	0	-
<i>CREM</i>	10p12.1	3 (10,7%)	3	0	-
<i>CELF2</i>	10p14	11 (39,3%)	11	0	-
<i>TNFRSF1A</i>	12p13	0	0	0	-
<i>TNFRSF7</i>	12p13	1 (3,6%)	1	0	-
<i>PAH</i>	12q23	6 (21,4%)	6	0	-
<i>MLH3</i>	14q24.3	5 (17,9%)	5	0	-
<i>TSC2</i>	16p13.3	8 (28,6%)	8	0	-
<i>CDH1</i>	16q22.1	1 (3,6%)	1	0	-
<i>BCL2</i>	18q21.3	14 (50,0%)	14	0	-
<i>KLK3</i>	19q13	6 (21,4%)	6	0	-

Del. Het, Delecciones en heterocigosis; Del. Hom, Delecciones en homocigosis; (-), sin sonda para el estudio de hipermetilación

6.2.1 Variaciones en el número de copias y estado de metilación de genes en meningiomas recidivados en función del grado histológico

El estudio por MLPA de genes implicados en la biología de los meningiomas mostró, en las recidivas de grado I, una aparente mayor incidencia de delección en *TP73*, *CDH13* o *TSC2*, aunque estadísticamente no fue significativa en ningún caso. En las recidivas de grados II-III, estuvieron significativamente más delecionados los genes *CDKN2A* (38,9% frente a 0, $p=0,027$), *CDKN2B* (48,4% frente a 0, $p=0,014$), *PAH* (33,3% frente a 0, $p=0,048$) y *BCL2* (72,2% frente a 10%, $p=0,002$) (figura 43A).

Las delecciones en homocigosis fueron más frecuentes en las recidivas de grado I que en las de grados superiores: las que afectaban a *ESR1* se detectaron en un 50% de los casos que mostraban delección, que implicó una frecuencia 1,5 veces superior en recidivas grado I que en las de grado II y III, y las que afectaban a *TP73* también se detectaron en un 50% de los casos con delección, lo que supuso una frecuencia 1,8 veces superior en recidivas de grado I frente a recidivas de grados superiores.

La hipermetilación no mostró diferencias en los grados de las recidivas de manera global, y el único gen que mostró diferencias estadísticamente significativas fue *ESR1*, hipermetilado en el 33,3% de las recidivas de grado II-III y en ninguna de grado I (figura 43B).

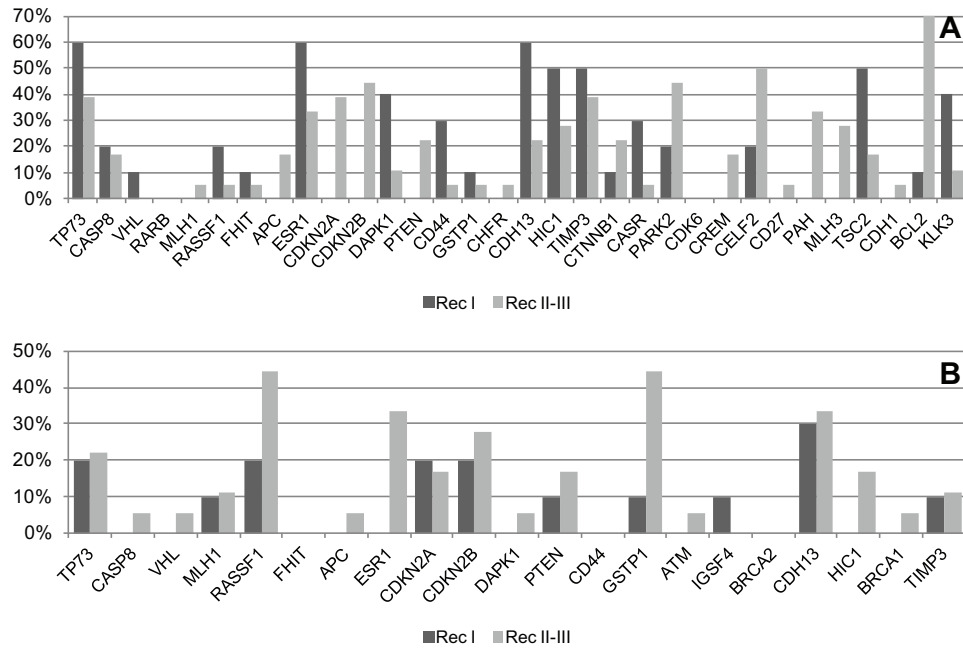


Figura 43. Alteraciones en meningiomas recidivados en función del grado histológico de los tumores. A: Delecciones en 31 genes analizados. B: Hipermetilación en 21 genes supresores de tumor.

6.3 Patrones genético-moleculares de los tumores primarios frente a las recidivas

Citogenética (cariotipo): se detectaron cariotipos con mayor número de alteraciones cromosómicas en las recidivas y en ellas no se hallaron casos con deleciones parciales de 1p como única anomalía; las deleciones en este cromosoma siempre iban ligadas a alguna pérdida de cromosomas enteros. Se observa que, en cuanto a las anomalías numéricas, la pérdida del cromosoma 22 fue similar en tumores primarios y recidivas. Sin embargo, las pérdidas en los cromosomas 10, 14, 18 y en los cromosomas sexuales fueron claramente superior en las recidivas. Con respecto a las anomalías estructurales, las reestructuraciones de los cromosomas 1 y 14 fueron mucho más frecuentes en las recidivas que en los tumores primarios, además, en los meningiomas recidivados las alteraciones en los cromosomas 1 y 14 no suelen presentarse de manera aislada, sino asociadas a otras pérdidas cromosómicas, habitualmente a la monosomía 22. La única alteración que fue significativamente más patente en recidivas que en meningiomas primarios, independientemente del grado, fue la monosomía total o parcial del cromosoma 14.

Citogenética molecular (iFISH): La pérdida de material en 22q detectada mediante iFISH, fue el evento más frecuente, tanto en tumores primarios como en recidivas, si bien en las recidivas fue ligeramente superior (diferencia no significativa). En las recidivas, 8 de 9 casos mostraron cariotipos con alteraciones más complejas que la monosomía 22 (88,9% de las muestras), frente a 27 de 61 que las mostraron en los primarios (44,3%) ($p=0,024$). De manera análoga al estudio del cariotipo, la deleción en 14q fue significativamente más frecuente en recidivas que en meningiomas primarios ($p=0,002$), pero asociada al grado II.

MLPA de NF2: La deleción de *NF2* no mostró diferencias significativas entre tumores primarios y recidivas, aunque los porcentajes fueron superiores en las recidivas (con un 61,2% en los primarios y un 81,0% en las recidivas). Asimismo, al analizar los distintos tipos de deleciones, detectamos, sin alcanzar diferencias estadísticas, que los porcentajes tanto de las deleciones totales como las deleciones parciales que afectaban a

la región 4.1, eran superiores en las recidivas. Las deleciones de la región rica en el α -hélice fueron superiores en los tumores primarios.

Con respecto a los *loci* examinados en el mismo kit de MLPA, encontramos que el *locus* 1p34 se detectó 3,3 veces más alterado en recidivas que en primarios ($p < 0,001$) y el *locus* 14q13, se mostró 2,2 veces más alterado en recidivas que en primarios ($p = 0,041$). Los *loci* 2q13, 3p22, 4q27 y 15q21 no mostraron diferencias entre meningiomas primarios y recidivas.

Variación en el número de copias (VNC): El número de genes con pérdida de heterocigosidad fue estadísticamente superior en recidivas ($6,4 \pm 0,6$) frente a tumores primarios ($4,9 \pm 0,3$) ($p = 0,039$). Con respecto a las pérdidas en homocigosis, su frecuencia en recidivas fue el doble que en tumores primarios. Detectamos LOH significativamente superiores en recidivas, en los genes *CDKN2A* ($p = 0,045$), *CDKN2B* ($p = 0,001$), *PTEN* ($p = 0,002$), *HIC1* ($p = 0,015$), *TIMP3* ($p = 0,015$) y *BCL2* ($p = 0,030$) (figura 44A).

Estado de metilación: Con respecto al estado de metilación, las recidivas mostraron mayor frecuencia de hipermetilación con $2,7 \pm 0,5$ genes hipermetilados frente a los primarios que contaron con $1,3 \pm 0,2$ ($p = 0,005$). Mayor aún es la diferencia al considerar los casos que tenían 3 o más TSG hipermetilados, que fueron el 42,9% de las recidivas frente al 15,2% de los tumores primarios ($p = 0,003$). Las recidivas mostraron hipermetilación significativamente superior en los genes *RASSF1* ($p = 0,010$) y *ESR1* ($p = 0,019$). Asimismo, fue aparentemente superior, aunque sin alcanzar significación, la metilación en *CDKN2B*, *CDH13*, *HIC1*, *TIMP3* y con menor diferencia, en *TP73* y *PTEN*, este último hipermetilado exclusivamente en meningiomas recidivados (figura 44B).

Resultados

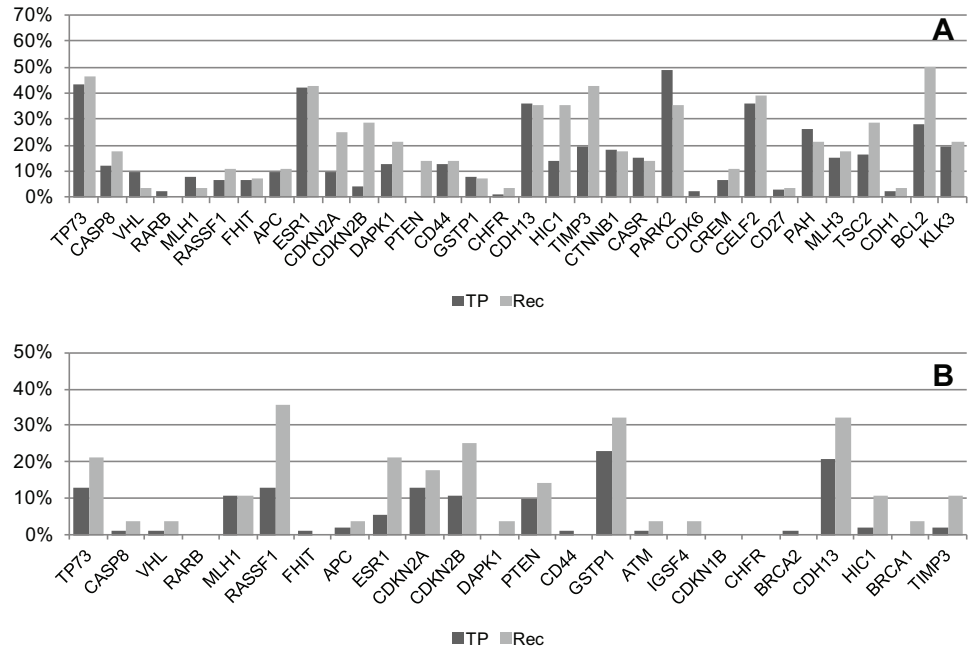


Figura 44. Comparación de las alteraciones en meningiomas primarios frente a recidivas. A: Deleciones génicas. B: Hipermetilación.

7 Relación de las variables genéticas analizadas y los parámetros clínicos e histopatológicos

7.1 Variables genéticas en relación con la localización tumoral

Con respecto a la relación entre las distintas localizaciones tumorales y las variables genéticas, nuestros resultados indican que las alteraciones cromosómicas estructurales fueron más frecuentes en tumores supratentoriales que infratentoriales (35,3% vs 5,7%, $p=0,022$) y la coexistencia de alteraciones numéricas y estructurales mantenía esta tendencia, aunque no alcanzó significación (29,4% vs 8,7% $p=0,067$). Asimismo, las deleciones detectadas mediante cariotipo en el cromosoma 1, fueron más frecuentes en los tumores supratentoriales ($p=0,038$). Las pérdidas del cromosoma 22, sin alcanzar significación estadística, fueron también más frecuentes en los tumores supratentoriales (63,4% vs 40,0%, $p=0,084$).

Estas diferencias se mantenían al estudiar los tumores en función de su grado histológico: en los tumores primarios de grado I, las alteraciones estructurales se dieron en tumores supratentoriales con excepción de un caso ($p=0,050$), y las alteraciones numéricas y estructurales simultáneamente se hallaron en el 5,3% de los infratentoriales frente a un 27,3% de los supratentoriales ($p=0,062$). De igual manera, las deleciones del cromosoma 1 y también las del cromosoma 14, se detectaron exclusivamente en tumores supratentoriales en los meningiomas de grado I ($p=0,05$ en ambos casos). Las pérdidas del cromosoma 22 en meningiomas grado I fueron significativamente superiores en los tumores supratentoriales (37,5% vs 66,7%, $p=0,053$). También detectamos pérdidas del *locus* 4q27 en el 51,2% de los tumores grado I supratentoriales frente al 26,1% infratentorial ($p=0,051$). En los tumores de grados superiores, aunque algunas tendencias se mantenían, los grupos eran demasiado pequeños para extraer conclusiones estadísticamente significativas.

Con respecto a los genes analizados y su relación con la localización de los tumores, la LOH fue significativamente más frecuente en los tumores infratentoriales, en los genes *DAPK1* (29,4% vs 5,2%, $p=0,03$), *GSTP1* (23,5% vs 0%, $p<0,001$), *HIC1* (28,5% vs 8,6%, $p=0,021$). Estas diferencias se mantuvieron en los tumores de grado I, para *DAPK1* ($p=0,010$), *GSTP1* ($p<0,001$) y *HIC1* ($p=0,050$).

Al contrario, con una mayor incidencia de LOH en tumores supratentoriales encontramos: *CASR* (2,9% vs 22,4%, $p=0,012$), *PARK2* (35,3% vs 56,9%, $p=0,045$), *PAH* (14,7% vs 32,8%, $p=0,057$) y *BCL2* (11,8% vs 37,9%, $p=0,007$); además, se observó cierta tendencia a la LOH en *RASSF1* en los tumores infratentoriales, que no alcanzó significación estadística ($p=0,080$). Estas diferencias se mantuvieron en los tumores de grado I para los genes *CASR* ($p=0,021$), *PARK2* ($p=0,049$) y *BCL2* ($p=0,006$). En tumores de grados superiores, el tamaño muestral llevó a encontrar diferencias significativas únicamente en la LOH de *PAH*, exclusiva en tumores supratentoriales ($p=0,015$).

7.2 Variables genéticas en relación al sexo

En el conjunto de meningiomas primarios, la inestabilidad cromosómica fue más patente en varones que en mujeres (50,0% vs 20,9%, $p=0,047$). Dentro del subgrupo de tumores primarios de grado I, las alteraciones en cromosomas diferentes del 1, 14 y 22 también fueron más frecuentes en varones aunque sin alcanzar significación (18,2% vs 50,0%, $p=0,070$). En tumores de grado II-III la pérdida de *NF2* se asoció estadísticamente a los varones (100% vs 53,8%, $p=0,046$); también el *locus* 1p34, mostró más alteraciones en hombres que mujeres (62,5% vs 16,7%, dato no significativo, $p=0,062$).

En los meningiomas primarios analizados, la inactivación de un TSG mediante delección en homocigosis o delección en heterocigosis más hipermetilación del promotor, fue más frecuente en varones que en mujeres (44,0% vs 23,9%, próximo a la significación estadística, $p=0,059$). Las pérdidas de heterocigosidad en más de 6 genes fueron más frecuentes en varones, sin alcanzar significación y de manera similar en el conjunto de tumores y en los meningiomas de grado I (37,0% vs 62,5%, $p=0,071$). El número de TSG con hipermetilación en meningiomas primarios de grado I, se relacionó con el sexo; los hombres tenían de media $1,2 \pm 0,2$ genes hipermetilados y las mujeres, $1,4 \pm 0,3$ ($p=0,048$). En los tumores de grado II-III se mantuvo la asociación entre el sexo y el número de genes hipermetilados: $1,9 \pm 0,4$ en hombres y $0,7 \pm 0,3$ en mujeres ($p=0,036$).

Cabe destacar que en el conjunto de tumores primarios, los 9 casos que mostraron LOH en *APC* eran mujeres (dato no significativo, $p=0,090$). La LOH en *MLH3* afectaba más a varones que a mujeres (32,0% vs 9,0%, $p=0,018$) y la LOH en *PARK2* tendió a

afectar más a los varones que a las mujeres (64,0% vs 43,3%, dato no significativo, $p=0,077$). La metilación en *RASSF1* también tendía a afectar más a los varones (24,0% vs 9,0%, $p=0,064$). Al estudiar estas variables en los distintos grados histológicos, hallamos que la hipermetilación en *CDKN2B* en los tumores de grado II-III, afectaba exclusivamente a varones (44,4%, $p=0,017$).

7.3 Variables genéticas y Ki-67

En el conjunto de tumores, el índice de Ki-67 aumentaba con la presencia de alteraciones numéricas, aunque no significativamente; este hecho se estableció en los tumores primarios de grado I, en los que la presencia de alteraciones numéricas se asoció estadísticamente con Ki-67 mayores ($p=0,039$). De manera análoga, los cariotipos normales o con alteraciones exclusivamente del cromosoma 22, presentaron menor expresión de Ki-67 ($p=0,015$ y $p=0,047$, respectivamente). La presencia de alteraciones en el cariotipo, en cromosomas distintos del 1, 14 y 22, se relacionó con mayores valores de Ki-67 ($p=0,033$), aunque en los diferentes grados histológicos el tamaño muestral no permitió extraer diferencias significativas.

En el conjunto de tumores, los casos con hipermetilación en *MLH1* mostraban valores crecientes de Ki-67 ($p=0,031$); esta relación se mantuvo en los tumores de grado I ($p=0,005$) y, aunque sin alcanzar significación estadística, también se mantenía la tendencia en los tumores de grados superiores ($p=0,058$). La hipermetilación en *PTEN*, en los meningiomas de grado I también se relacionó con valores crecientes de Ki-67 ($p=0,014$). El grupo de tumores de grados superiores, probablemente por su tamaño, no mostró asociación estadística entre las variables analizadas.

8 Estudio de la relación entre las variables analizadas en los tumores primarios recidivantes y no recidivantes

Una vez vistas las características y los perfiles genéticos de los tumores primarios y las recidivas tumorales de los meningiomas, se analiza a continuación el comportamiento de los tumores primarios en función de si se diagnosticó clínicamente una recidiva posterior o no, a fin de establecer un perfil genético dentro de los tumores primarios, que pudiera indicar la posible capacidad de recidivar de esos tumores. De los 92 tumores primarios estudiados 51 no sufrieron recidivas, y 27 recidivaron, habiéndose realizado una resección quirúrgica total; en 8 casos la resección fue parcial y 6 fallecieron prematuramente. A continuación relacionamos las variables estudiadas en estos dos grupos de meningiomas primarios.

8.1 Variables clínicas y neuropatológicas

Con respecto a las características clínicas de los pacientes, los resultados en el conjunto de meningiomas primarios mostraron que la recidiva tumoral solo fue un fenómeno significativamente más frecuente en pacientes de género masculino, con un 59,09% de recidivas frente al 33,3% en mujeres ($p=0,031$). Así mismo, se observaron diferencias significativas al estudiar el tamaño tumoral, presentando un diámetro mayor de media $5,2\pm 0,3$ cm en los tumores que recidivaron, frente a $3,8\pm 0,8$ cm en los que no lo hicieron ($p=0,001$).

Con respecto a las características histopatológicas, los casos que sufrieron recidivas presentaban tumores con mayor índice mitótico, con una media de $3,3\pm 1,0$ mitosis en 20 HPF, frente a $1,5\pm 0,3$ los que no las sufrieron ($p=0,043$). Igualmente, el índice de Ki-67 fue mayor, con un 5,9% de inmunorreactividad en los tumores que tuvieron recidivas frente a un 3,0% en los que no ($p=0,027$).

Con respecto al grado histológico, de los 70 tumores primarios de grado I, 18 recidivaron. En estos meningiomas de grado I que recidivaron, el tamaño tumoral fue significativamente superior que en los que no recidivaron, con un diámetro mayor, de media $4,9\pm 0,4$ cm frente a $3,8\pm 0,2$ cm, respectivamente ($p=0,009$).

A nivel histopatológico, presentaron un mayor índice de Ki-67 máximo, con un $1,8\pm 0,2$ de inmunorreactividad los tumores que tuvieron recidivas frente a un $1,4\pm 0,8$ en los que no ($p=0,042$).

El sexo, la edad al diagnóstico, la histología, el síntoma inicial, la localización y el número de mitosis no se relacionaron estadísticamente con la capacidad de recidivar en estos tumores de grado I.

De los 22 tumores de grado II, 9 recidivaron a pesar de la radicalidad de la cirugía. Los resultados relacionan la aparición de recidivas únicamente con el sexo y con el tamaño tumoral. Recidivaron los tumores del 87,5% de los hombres frente al 30,8% de las mujeres ($p=0,017$), y los pacientes que sufrieron recidivas presentaban tumores con una media de $5,7\pm 0,5$ cm frente a $4,1\pm 0,5$ en los que no las sufrieron ($p=0,043$).

La edad al diagnóstico, la histología, el síntoma inicial y la localización, no se relacionaron con la capacidad de recidivar. El número de mitosis y el índice de proliferación Ki-67 tampoco se asociaron con el fenómeno de la recidiva tumoral en este grupo de pacientes.

8.2 Características genéticas implicadas en la tendencia a recidivar en meningiomas primarios

8.2.1 Variables en citogenética clásica

De 57 pacientes con meningiomas primarios en los que se estudió el cariotipo, 33 no tuvieron recidivas tumorales mientras que 14 sí que las tuvieron (no se incluyen en el análisis de resultados los pacientes que sufrieron recidivas tras resecciones subtotales). Al comparar estos dos grupos, detectamos diferencias en cuanto a los hallazgos cariotípicos (tabla 25):

Las alteraciones en el cromosoma 14, sin llegar al grado de significancia, fueron más frecuentes en los tumores que recidivaron frente a los que no lo hicieron; la pérdida de alguno de los gonosomas fue estadísticamente más patente en los pacientes que sufrieron recidivas ($p=0,050$).

Tabla 25. Distribución de las alteraciones citogenéticas determinadas mediante el estudio del cariotipo en función de la evolución de los casos

	#22	#1	#14	otras	inestabilidad	# sexuales
TP (n=45)	40,4%	17,0%	10,6%	27,7%	25,5%	12,8%
TP NO REC (n=31)	42,4%	21,2%	6,1%	21,1%	24,2%	6,1%
TP REC (n=14)	35,7%	7,1%	21,4%	42,9%	28,6%	28,6%
TP I (n=34)	38,2%	11,8%	5,9%	20,6%	26,5%	11,8%
TP I NO REC (n=26)	34,6%	11,5%	3,8%	11,5%	26,9%	7,7%
TP I REC (n=8)	50,0%	12,5%	12,5%	50,0%	25,0%	25,0%
TP II (n=11)	46,2%	30,8%	23,1%	46,2%	23,1%	15,4%
TP II NO REC (n=5)	71,4%	57,1%	14,3%	57,1%	14,3%	0,0%
TP II REC (n=6)	16,7%	0,0%	33,3%	23,3%	33,3%	33,3%

TP, tumor primario; Rec, recidiva; I, grado I; II, grado II; n, número de casos; #, cromosoma; otras, otras alteraciones cromosómicas distintas de las que afectan a los cromosomas 1, 14, 22 o sexuales; inestabilidad, presencia de alteraciones no clonales. Se señalan en negrita las diferencias estadísticamente significativas.

Al analizar estas pérdidas en los distintos grados de los tumores se observó que, en meningiomas de grado I, la proporción de casos con monosomía 22/22q- fue similar en los tumores que recidivaron y en los que no lo hicieron, a diferencia de los casos de grados superiores, en que fue más frecuente esta anomalía –sin alcanzar significación estadística- en los tumores que no recidivaron ($p=0,078$). La misma situación se dio para las pérdidas en 1p ($p=0,070$). La monosomía 14/14q- determinada mediante cariotipado, no presentó diferencias significativas en los diferentes grados, pero fue aparentemente superior en los tumores que sufrieron recidivas tumorales en ambos grados. Sin embargo, hay que considerar que la muestra de tumores de grado II fue de pequeño tamaño.

La presencia de alteraciones en otros cromosomas diferentes de los clásicamente implicados en la ontogenia y progresión de los meningiomas, sí que mostró diferencias significativas en los meningiomas de grado I, con una frecuencia mayor en los casos que sufrieron recidivas (50,0%) que en aquellos que no las sufrieron (11,5%) ($p=0,037$). Sin embargo, éstas no fueron discriminatorias en el grado II. Así mismo, las alteraciones en los gonosomas también fueron significativamente más frecuentes en los meningiomas de grado I que recidivaron ($p=0,045$) (tabla 25).

8.2.2 Variables en citogenética molecular (iFISH)

De 61 casos con meningiomas primarios estudiados mediante iFISH, en 14 se produjeron recidivas tumorales, frente a 37 que no las sufrieron (tabla 26). No se incluyen en el análisis de resultados los pacientes que sufrieron recidivas tras resecciones subtotalet. Al analizar la relación, entre la presencia de delección en 1p, en 14q y en 22q y la capacidad de recidivar, encontramos que los TP que no recidivaron mostraron ausencia de alteraciones en los cromosomas estudiados, o exclusivamente monosomía del cromosoma 22, en un 64,9% de los casos, frente al 42,9% de los que recidivaron (diferencia no significativa).

Los casos con alteraciones en los cromosomas 1 y/o 14 fueron más frecuentes en el grupo de tumores que recidivó, sin alcanzar significación estadística (35,1% frente a 57,1%, $p=0,064$). Las alteraciones en el cromosoma 14 fueron significativamente superiores en los tumores que sufrieron recidivas que en aquellos que no las sufrieron (42,9% frente a 13,5%, $p=0,050$).

Tabla 26. Evolución en meningiomas primarios en función del grado histopatológico y del patrón citogenético obtenido por iFISH. Frecuencias sobre el patrón

	22q-	1p-	14q-	Sin alteración o 22q-	Alteración en #1 y/o #14
TP (n=51)	54,9%	29,4%	21,6%	51,8%	41,2%
TP NO REC (n=37)	48,6%	24,3%	13,5%	64,9%	35,1%
TP REC (n=14)	71,4%	42,9%	42,9%	42,9%	57,1%
TP grado I (n=40)	55,0%	25,0%	12,5%	67,5%	32,5%
TP I NO REC (n=31)	48,4%	22,6%	12,9%	67,7%	32,3%
TP I REC (n=9)	77,8%	33,3%	11,1%	66,7%	33,3%
TP grado II-III (n=11)	54,5%	45,5%	54,5%	27,3%	72,70%
TP II-III NO REC (n=6)	50,0%	33,3%	16,7%	50,0%	50,0%
TP II-III REC (n=5)	60,0%	60,0%	100,0%	0,0%	100,0%

TP, tumor primario; TP NO REC, tumor primario no recidivante; TP REC, tumor primario recidivante. Se señalan en negrita las diferencias estadísticamente significativas

En los meningiomas de grado I no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de alteración en los cromosomas estudiados en función de la evolución. En los meningiomas de grado II, por su parte, la ausencia de alteración o la

presencia de la monosomía 22 como única alteración, fue exclusiva en tumores que no recidivaron, si bien esta diferencia no alcanzó significación. Además, detectamos 14q- en todos los casos que sufrieron recidivas frente a un 16,7% en los casos que no recidivaron ($p=0,015$).

8.2.3 Evolución de los meningiomas en relación al estado del gen *NF2*

Se analizaron 72 tumores primarios, de los que 50 no recidivaron y 22 recidivaron a pesar de la radicalidad de la cirugía. No se incluyen en el análisis de resultados los pacientes que sufrieron recidivas tras resecciones subtotales. La evolución de los pacientes en función del estado alélico de *NF2* se muestra en la tabla 27. A la luz de estos datos, encontramos que, en ambos grupos, las deleciones del gen *NF2* son un fenómeno frecuente -afecta a más de la mitad de los casos- y detectamos diferencias muy pequeñas entre los tumores que no recidivaron y aquellos que recidivaron.

Cuando analizamos este gen en función del grado histológico de los tumores primarios, encontramos diferencias entre los meningiomas de grado I y los de grado II-III. En los tumores primarios de grado I ($n=54$, de los que recidivaron 14) las proporciones deleción/normal fueron similares en los casos que no recidivaron y en los que recidivaron. En los meningiomas de grados superiores ($n=18$, de los que recidivaron 8) detectamos un estatus normal de *NF2* en el 40,2% de los tumores que no recidivaron frente a un 12,5% en los que recidivaron, lo que supone más del triple de diferencia, si bien estas diferencias no fueron significativas (tabla 27).

Tabla 27. Evolución en meningiomas primarios en función del patrón estado alélico del gen *NF2* y análisis en función del grado histológico de los tumores

		No recidivan	Recidivan
TP	<i>NF2</i> Normal	21 (42,0%)	6 (27,3%)
	<i>NF2</i> Delecionado	29 (58,0%)	16 (72,7%)
TP Grado I	<i>NF2</i> Normal	17 (42,5%)	5 (35,7%)
	<i>NF2</i> Delecionado	23 (57,5%)	9 (64,3%)
TP Grado II-III	<i>NF2</i> Normal	4 (40,0%)	1 (12,5%)
	<i>NF2</i> Delecionado	6 (60,0%)	7 (87,5%)

TP, Tumores primarios.

8.2.4 Evolución de los meningiomas en relación al estado alélico de los *loci* cromosómicos 1p34, 2q13, 3p22, 4q27, 14q13 y 15q21 incluidos en el estudio P044-NF2

Los *loci* en los que hallamos deleciones heterocigóticas cuando analizábamos el estado del gen *NF2*, en relación a la evolución de los pacientes, se muestran en la tabla 28. Los *loci* 1p34 y 4q27 mostraron deleciones 3,5 y 1,7 veces más frecuentes, respectivamente, en los meningiomas primarios que recidivaron, si bien solo las deleciones en 1p34 fueron estadísticamente superiores en el grupo de tumores que recidivaron ($p=0,030$). El locus 2q13 se detectó sólo en tumores primarios que no recidivaron ($p=0,045$) (figura 45).

Tabla 28. Incidencia de deleción en los *loci* adicionales estudiados con el kit P044-NF2, en función de la aparición de recidiva tumoral

Deleción	Meningiomas Primarios		Meningiomas Grado I		Meningiomas Grado II-III	
	TP NO REC	TP REC	TP I NO REC	TP I TP REC	TP II-III NO REC	TP II-III TP REC
1p34	14,3%	45,5%	10,8%	42,9%	22,2%	50,0%
2q13	16,3%	0,0%	20,0%	0,0%	0,0%	0,0%
3p22	42,9%	31,8%	45,0%	35,7%	33,3%	25,0%
4q27	28,6%	54,5%	32,5%	64,3%	22,2%	37,5%
14q13	16,3%	25,0%	15,0%	8,3%	22,2%	50,0%
15q21	46,9%	54,5%	50,0%	50,0%	33,3%	62,5%

TP, tumor primario; TP NO REC, tumor primario no recidivante; TP REC, tumor primario recidivante. Se señalan en negrita las diferencias estadísticamente significativas.

Cuando analizamos estas pérdidas en función del grado histológico, en el *locus* 1p34 hallamos una incidencia significativamente superior en meningiomas primarios de grado I que recidivaron frente a los que no lo hicieron ($p=0,018$). Lo mismo observamos para el *locus* 4q27 ($p=0,037$). El resto de *loci* no mostraron diferencias significativas. En los meningiomas de grado II y III que recidivaron, las deleciones en 14q13 fueron más de 2 veces más frecuentes que en los tumores de estos grados que no recidivaron, sin alcanzar significación estadística.

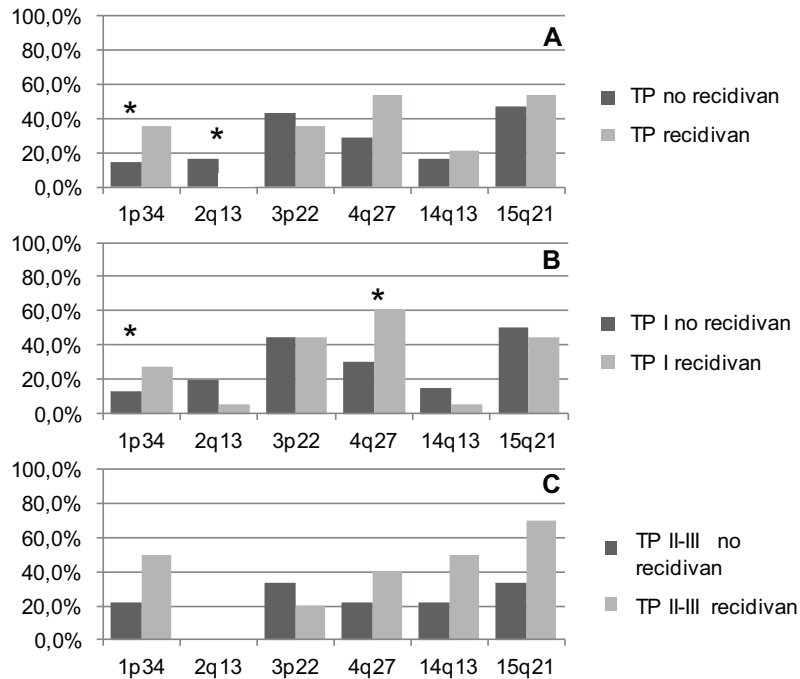


Figura 45. Porcentaje de delección en las regiones cromosómicas analizadas en función de la evolución de los pacientes. A. Meningiomas primarios independiente del grado; B. Meningiomas de grado I; C. Meningiomas de grado II-III. Se indican * en los loci que fueron significativamente diferentes entre los grupos comparados.

8.2.5 Impacto de la VNC y del estado de metilación de genes supresores de tumor en la evolución de los meningiomas.

De los 92 tumores primarios, 51 no sufrieron recidivas frente a 27 que sí que las sufrieron. El número de genes con LOH no se asoció con la tendencia a recidivar, los casos que sufrieron recidivas mostraban LOH de media en 5,4 genes, frente a 4,9 genes en los que no recidivaron. Las pérdidas en homocigosis en meningiomas primarios de grado I fueron esporádicas salvo para los genes *TP73* (15 casos) y *ESR1* (7 casos), y no mostraron diferencias significativas con la evolución de los tumores.

Con respecto al estatus de metilación, el número de genes con hipermetilación se asoció con la tendencia a recidivar: fue de media $2,1 \pm 0,5$ en el grupo de tumores que recidivaron y $0,9 \pm 0,1$ en los que no lo hicieron ($p=0,031$). A mayor número de genes con hipermetilación, esta asociación era más fuerte: el 44,4% de los tumores que recidivaron

mostraban hipermetilación en 2 o más de los genes analizados, frente al 21,6% de los casos que no recidivaron ($p=0,035$). En el mismo sentido, el 29,6% de los casos que recidivaron mostraron hipermetilación en 3 o más de los genes estudiados, frente al 7,8% de los que no recidivaron ($p=0,019$). El único gen concreto cuya alteración se relacionó estadísticamente de manera independiente con la capacidad de recidivar fue *CDKN2B*: el 25,9% de los tumores que recidivaron tenían hipermetilado *CDKN2B*, frente al 3,9% de los que no recidivaron ($p=0,07$).

La combinación de la inactivación total de un TSG o la presencia de 3 o más TSG con hipermetilación se asoció fuertemente con la capacidad de recidivar: recidivaron el 37,0% de los casos que cumplían esta premisa, frente al 11,8% de los que no la cumplían ($p=0,009$).

8.2.5.1 Evolución de los meningiomas de grado I en función de las VNC y del estado de metilación en genes supresores de tumor

De los 70 pacientes con meningiomas primarios grado I, 41 no sufrieron recidivas frente a 18 que sufrieron recidivas tumorales a pesar de la resección completa de sus tumores. No se incluyen en el análisis de resultados los pacientes que sufrieron recidivas tras resecciones subtotales.

La incidencia de LOH en los 32 genes en que se detectaron alteraciones fue similar en ambos grupos (tabla 29). Al analizar las pérdidas de heterocigosidad gen a gen, en los genes *TP73*, *ESR1*, *CDH13* y *PARK2* fueron frecuentes, y ligeramente superiores en los meningiomas que recidivaron (diferencias no significativas). *RASSF1*, *GSTP1* y *CD27*, aunque presentes en menor porcentaje de casos, mostraron pérdidas 4,6, 1,7 y 4,6 veces superiores en los tumores que recidivaron que en aquellos que no lo hicieron.

Por último, la hipermetilación fue significativamente más frecuente en los meningiomas de grado I que recidivaron, con una media de genes afectados de $2,5 \pm 0,7$ en los casos que recidivaron frente a $1,0 \pm 0,2$ en los que no lo hicieron ($p=0,030$) (tabla 29). Además, el 33,3% de los pacientes con tumores que recidivaron presentaban hipermetilación en 3 o más genes, frente al 10,3% de los que no recidivaron ($p=0,043$). La inactivación de un TSG por metilación y LOH del otro alelo no se asoció con la capacidad de recidivar, pero sí la combinación de inactivación y metilación en 3 o más

genes supresores de tumor: recidivaron el 53,8% de los tumores que cumplían esta premisa ($p=0,05$).

Tabla 29. Variaciones en número de copias y del número de genes afectados de hipermetilación en meningiomas de grado I en función de la presencia de recidivas

	Meningiomas de grado I sin recidivar (n=41)	Meningiomas de grado I que recidivaron (n=18)
Sin pérdidas de LOH	4 (9,7%)	2 (11,8%)
LOH de 1 a 3 genes	9 (21,9%)	5 (27,8%)
LOH de 4 a 6 genes	16 (39,1%)	5 (27,8%)
LOH>6 genes	12 (29,3%)	6 (33,3%)
Sin hipermetilación	15 (36,6%)	3 (16,7%)
Hipermetilación de 1 a 3 genes	25 (61,0%)	12 (66,7%)
Hipermetilación en más de 4 genes	1 (2,4%)	3 (21,7%)

LOH: pérdida de heterocigosidad. Se indican en negrita los valores que mostraron diferencias significativas ($p<0,050$); n: número.

La hipermetilación fue superior en meningiomas primarios de grado I que sufrieron recidivas en los genes *MLH1* (x3,4, $p<0,001$), *RASSF1* (x2,3, $p=0,048$) y *CDKN2B* (x4,6, $p=0,046$) (figura 46). Además, fue frecuente, aunque sin diferencias significativas, en *GSTP1*. En este grupo de tumores, fue también aparentemente superior en los genes *TP73* (x2,3), *ESR1* (x3,4), *CDKN2A* (x2,8), *PTEN* (x3,0) y *CDH13* (x1,6). Los resultados de VNC y de hipermetilación obtenidos para cada gen se muestran en la tabla 30.

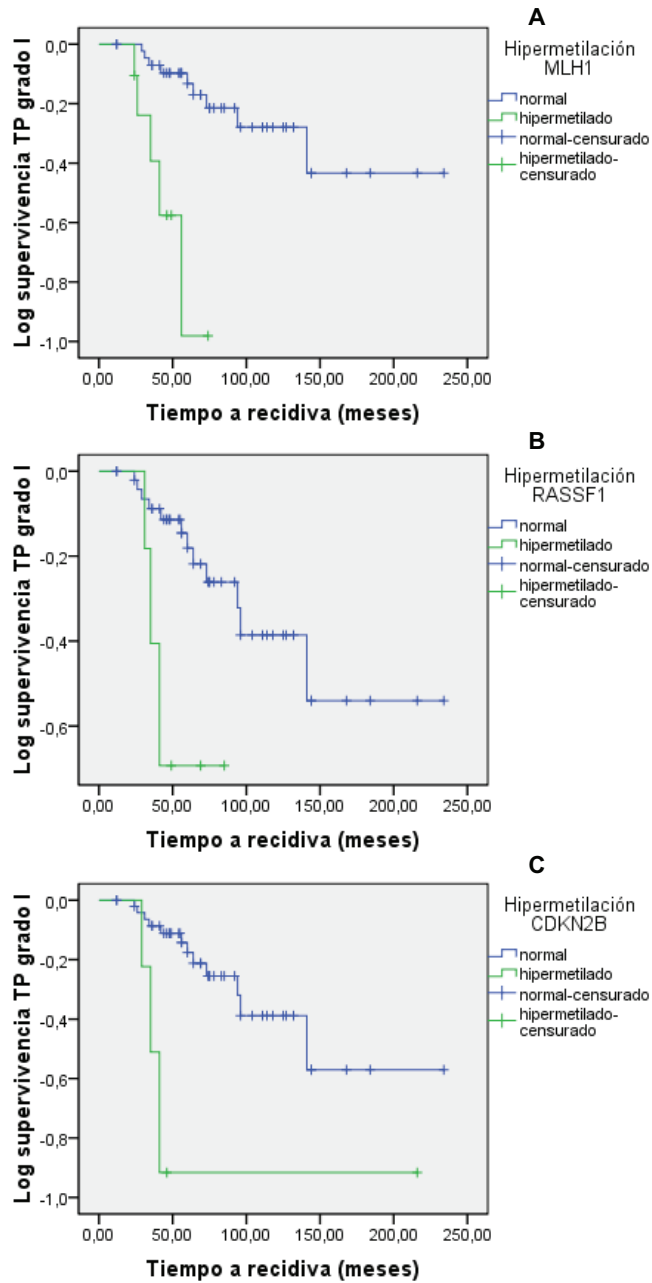


Figura 46. Curvas de Kaplan-Meier para el análisis estadístico de la aparición de recidivas en función del tiempo, en meningiomas primarios de grado I. A: hipermetilación en MLH1 ($p < 0,001$). B: Hipermetilación en RASSF1 ($p = 0,048$). C: Hipermetilación en CDKN2B ($p = 0,046$).

Tabla 30. Variaciones en el número de copias y en el estado de metilación de los genes analizados con el kit MLPA ME001-C2 en meningiomas de grado I, en los dos grupos analizados.

	Pérdida de heterocigidad		Hipermetilación	
	TP I NO REC	TP I REC	TP I NO REC	TP I REC
<i>TP73</i>	19 (46,3%)	10 (55,6%)	3 (7,3%)	3 (16,7%)
<i>CASP8</i>	4 (9,8%)	2 (11,1%)	0	0
<i>VHL</i>	6 (14,6%)	1 (5,6%)	0	0
<i>RARB</i>	0	2 (11,1%)	0	0
<i>MLH1</i>	3 (7,3%)	1 (5,6%)	4 (9,8%)	6 (33,3%)
<i>RASSF1</i>	2 (4,9%)	4 (22,2%)	3 (7,3%)	3 (16,7%)
<i>FHIT</i>	5 (12,2%)	2 (11,1%)	1 (2,4%)	0
<i>APC</i>	5 (12,2%)	2 (11,1%)	0	1 (5,6%)
<i>ESR1</i>	17 (41,5%)	10 (55,6%)	2 (4,9%)	3 (16,7%)
<i>CDKN2A</i>	4 (9,8%)	1 (5,6%)	4 (9,8%)	5 (27,8%)
<i>CDKN2B</i>	2 (4,9%)	0	2 (4,9%)	4 (22,2%)
<i>DAPK1</i>	7 (17,1%)	3 (16,7%)	0	0
<i>PTEN</i>	0	0	3 (7,3%)	4 (22,2%)
<i>CD44</i>	5 (12,2%)	3 (16,7%)	0	1 (5,6%)
<i>GSTP1</i>	4 (9,8%)	3 (16,7%)	10 (24,4%)	6 (33,3%)
<i>ATM</i>	0	0	0	1 (5,6%)
<i>IGSF4</i>	0	0	0	0
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	1 (2,4%)	0	0	0
<i>BRCA2</i>	0	0	0	1 (5,6%)
<i>CDH13</i>	16 (39,0%)	9 (50,0%)	7 (17,1%)	5 (27,8%)
<i>HIC1</i>	7 (17,1%)	4 (22,2%)	1 (2,4%)	1 (5,6%)
<i>BRCA1</i>	0	0	0	0
<i>TIMP3</i>	8 (19,5%)	5 (27,8%)	1 (2,4%)	1 (5,6%)
<i>CTNNB1</i>	6 (14,6%)	1 (5,6%)	-	-
<i>CASR</i>	7 (17,1%)	2 (11,1%)	-	-
<i>PARK2</i>	16 (39,0%)	8 (44,4%)	-	-
<i>CDK6</i>	0	0	-	-
<i>CREM</i>	2 (4,9%)	0	-	-
<i>CELF2</i>	13 (31,7%)	5 (27,8%)	-	-
<i>TNFRSF1A</i>	0	0	-	-
<i>CD27</i>	1 (2,4%)	2 (11,1%)	-	-
<i>PAH</i>	10 (24,4%)	3 (16,7%)	-	-
<i>MLH3</i>	4 (9,8%)	1 (5,6%)	-	-
<i>TSC2</i>	8 (19,5%)	3 (16,7%)	-	-
<i>CDH1</i>	2 (4,9%)	0	-	-
<i>BCL2</i>	10 (24,4%)	4 (22,2%)	-	-
<i>KLK3</i>	10 (24,4%)	3 (16,7%)	-	-

LOH, pérdida de heterocigidad; TP NO REC, tumor primario que no recidiva; TP REC, tumor primario que recidiva; (-), sin sonda para el estudio de hipermetilación.

8.2.5.2 Evolución de los meningiomas de grado II en función de las VNC y del estado de metilación en genes supresores de tumor

En los 22 pacientes con meningiomas primarios grado II estudiados, 9 sufrieron recidivas tumorales a pesar de la resección completa. No se incluyen en el análisis de resultados los pacientes que sufrieron recidivas tras resecciones subtotales.

La LOH en los pacientes que no sufrieron recidivas tumorales afectó de media a 4,6 genes frente a 5,8 en aquellos que sí sufrieron recidivas. Por su parte, la hipermetilación afectó a 0,7 genes de media en los que no recidivaron frente a 1,2 en los que sí lo hicieron (diferencias no significativas). Por ello, podemos concluir que la incidencia de VNC y de hipermetilación de manera global, fue similar en ambos grupos de pacientes (tabla 31).

Ni la presencia de hipermetilación en más de 3 TSG, ni la inactivación completa de un TSG mediante LOH e hipermetilación se relacionaron con la capacidad de recidivar. No obstante, el 33,3% de los tumores que tenían la combinación de inactivación en al menos un gen y/o hipermetilación en 3 o más, recidivaron; ningún caso de los que no recidivó cumplió esta premisa ($p=0,05$).

Tabla 31. Resumen de las variaciones en número de copias y del número de genes afectados de hipermetilación en meningiomas de grado II en función de la presencia de recidivas

	Meningiomas de grado II sin recidivas (N=10)	Meningiomas de grado II que recidivaron (N=9)
Sin pérdidas de LOH	0	0
LOH de 1 a 3 genes	3 (30,0%)	2 (22,2%)
LOH de 4 a 6 genes	5 (50,0%)	4 (44,4%)
LOH>6 genes	2 (20,0%)	3 (33,3%)
Sin hipermetilación	4 (40,0%)	3 (33,3%)
Hipermetilación de 1 a 3 genes	6 (60,0%)	6 (66,7%)
Hipermetilación en más de 4	0	0

LOH: pérdida de heterocigosidad

El análisis detallado de las pérdidas de heterocigosidad mostró alteraciones frecuentes aunque sin diferencias, entre los tumores de grado II que recidivaron y los que no lo hicieron en *ESR1*, *CTNNB1*, *PARK2*, *CELF2*, *PAH* y *MLH3*. En los meningiomas de

grado II que no recidivaron estaban aparentemente más afectados *TP73* y *CASP8*, si bien las diferencias no resultaron significativas. En los casos que sufrieron recidivas, hallamos LOH con mayor frecuencia en los genes *CREM*, que fue próximo a la significación estadística y *BCL2* que no alcanzó significación.

Con respecto a la hipermetilación en los casos que recidivaron, hallamos exclusivamente alterados, los genes *TP73* (27,3%) y *CDKN2B* (27,3%), sin diferencias estadísticamente significativas, si bien cabe decir que la afectación de *CDKN2B* fue próxima a la significación estadística. Los resultados de VNC y de hipermetilación obtenidos para cada gen se muestran en la tabla 32.

Tabla 32. Variaciones en número de copias y del estado de metilación de los genes analizados con el kit MLPA ME001-C2 en meningiomas de grado II, en los dos grupos analizados

	Pérdida de heterocigosidad		Hipermetilación	
	TP II NO REC	TP II REC	TP II NO REC	TP II REC
<i>TP73</i>	4 (40,0%)	2 (22,2%)	0	1 (11,1%)
<i>CASP8</i>	2 (20,0%)	1 (11,1%)	0	0
<i>VHL</i>	0	1 (11,1%)	0	0
<i>RARB</i>	0	0	0	0
<i>MLH1</i>	0	1 (11,1%)	0	0
<i>RASSF1</i>	0	0	2 (20,0%)	1 (11,1%)
<i>FHIT</i>	0	0	0	0
<i>APC</i>	0	2 (22,2%)	0	1 (11,1%)
<i>ESR1</i>	4 (40,0%)	4 (44,4%)	0	0
<i>CDKN2A</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	1 (10,0%)	0
<i>CDKN2B</i>	1 (10,0%)	0	0	3 (33,3%)
<i>DAPK1</i>	1 (10,0%)	0	0	0
<i>PTEN</i>	0	0	0	1 (11,1%)
<i>CD44</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	0	0
<i>GSTP1</i>	0	0	2 (20,0%)	2 (22,2%)
<i>ATM</i>	0	0	0	0
<i>IGSF4</i>	0	0	0	0
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	0	0	0	0
<i>CDH13</i>	2 (20,0%)	2 (22,2%)	2 (20,0%)	2 (22,2%)
<i>HIC1</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	0	0
<i>BRCA1</i>	0	0	0	0
<i>TIMP3</i>	2 (20,0%)	2 (22,2%)	0	0
<i>CTNNB1</i>	4 (40,0%)	3 (33,3%)	-	-
<i>CASR</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	-	-
<i>PARK2</i>	6 (60,0%)	7 (77,8%)	-	-
<i>CDK6</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	-	-
<i>CREM</i>	0	3 (33,3%)	-	-
<i>CELF2</i>	5 (50,0%)	5 (55,6%)	-	-
<i>TNFRSF1A</i>	0	0	-	-
<i>CD27</i>	0	1 (11,1%)	-	-
<i>PAH</i>	4 (40,0%)	3 (33,3%)	-	-
<i>MLH3</i>	3 (30,0%)	3 (33,3%)	-	-
<i>TSC2</i>	0	1 (11,1%)	-	-
<i>CDH1</i>	0	0	-	-
<i>BCL2</i>	2 (20,0%)	5 (55,6%)	-	-
<i>KLK3</i>	1 (10,0%)	1 (11,1%)	-	-

TP, tumor primario; NO REC, no recidiva, REC, recidiva; (-), sin sonda para el estudio de hipermetilación.

DISCUSIÓN

El meningioma es el tumor intracraneal más frecuente en la edad adulta. Su máxima incidencia se da entre la quinta y la séptima década de vida, con una edad mediana de presentación de 65 años y una clara predominancia femenina, que actualmente permanece inexplicada ^(6,50,290). La agresividad del meningioma se establece atendiendo a sus características histopatológicas, de manera que se clasifican en tumores de grado I o benignos, grado II o atípicos y grado III o anaplásicos ⁽⁴⁾. Aunque el curso benigno y el crecimiento lento es lo más habitual, la recidiva tumoral es la principal complicación que condiciona el comportamiento clínico de la enfermedad y la supervivencia global de los pacientes: entre un 10-15% sufren recidivas en un plazo de 5 años y hasta el 37% en 10 años ^(49,97,119,165). El porcentaje de recidivas es claramente superior en meningiomas atípicos y anaplásicos, pero la gran frecuencia de meningiomas grado I, implica que el 80% de todas ellas se produzcan en pacientes con meningiomas histológicamente benignos ⁽¹⁶⁵⁾. Debido a esto, la necesidad de una estratificación del riesgo más precisa, es acuciante.

En este trabajo estudiamos 120 meningiomas procedentes de 101 pacientes, con el objetivo de evaluar el potencial pronóstico de un conjunto de genes supresores de tumor, implicados en la iniciación y progresión neoplásicas. Para este estudio se seleccionaron, además, una serie de meningiomas primarios de grado I que habían sufrido recidivas tumorales, con el fin de evaluar qué características determinan tal evolución dentro estos tumores, benignos desde un punto de vista histológico.

1 Características clínicas e histopatológicas relacionadas con la recidiva tumoral

Los parámetros clínicos más relacionados con la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con meningiomas son la radicalidad de la cirugía, el tamaño tumoral, la localización ^(10,30,120,166), la edad al diagnóstico ^(10,72,166) y el género ^(10,30,169), además, por supuesto, del grado histológico.

Tras la resección quirúrgica de la lesión, la capacidad de recidivar de los meningiomas podría deberse a la persistencia local de células tumorales, a la microinvasión de los vasos linfáticos, o a una resección microscópica incompleta del tumor. Un mecanismo alternativo, consistiría en el desarrollo de un nuevo tumor,

consecuencia de una predisposición genética incrementada y/o un ambiente favorable. A pesar de la identificación de factores que influyen en la aparición de recidivas, en la actualidad no se dispone de modelos predictivos eficaces ^(166,254). La literatura sitúa la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con resecciones totales, en el 88% a los 5 años del diagnóstico, y en el 75% a los 10 años; por su parte, en pacientes con resecciones subtotales, alcanza el 61% y el 39%, respectivamente ⁽⁴⁰⁾. En nuestros resultados, la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con resecciones completas fue próxima al 70%, siendo algo menor a lo descrito en la bibliografía. En los tumores que habían sido resecados parcialmente no alcanzó el 25%. Así, la radicalidad de la cirugía se asoció fuertemente con la evolución.

El tamaño tumoral fue estadísticamente superior en los tumores que recidivaron, con una media 1,4 cm mayor que en aquellos que no lo hicieron, de manera análoga a lo descrito en la bibliografía. ^(30,165,254,291,292).

Los meningiomas con localización espinal fueron significativamente de menor tamaño que los de las demás localizaciones y fueron también los que menos recidivaron. En el mismo sentido, los tumores de la base del cráneo fueron los de mayor tamaño; esta diferencia no fue significativa de manera global, pero al compararlo con los tumores de la fosa posterior, detectamos que recidivaban con mayor frecuencia, lo que coincide con descripciones previas ^(120,292), probablemente por las dificultades que entraña la cirugía en estas localizaciones.

Con respecto a la edad de debut de la enfermedad, que se ha referido en torno a los 65 años ^(3,4), encontramos una disminución de 5 años. Este descenso es probablemente consecuencia de la elevada proporción de meningiomas que recidivaron dentro de los tumores de grado I que incluimos en nuestro estudio; se sabe que ofrecen peor pronóstico los tumores que debutan a edades más tempranas ⁽²⁹²⁾, por lo que es coherente la detección de una edad mediana menor.

Está descrito que el grado histológico es un factor fundamental relacionado con la capacidad de recidivar de estos tumores. La incidencia de recidivas en los meningiomas de grado I es de un 7-20%, de un 30-40% en los meningiomas de grado II y de un 50-80% en los meningiomas de grados III ^(72,73), porcentajes que habitualmente resultan significativamente diferentes. En nuestra serie, la proporción de meningiomas de grado I que recidivaron fue superior (35,9%) a causa de la selección de los casos. El periodo de

seguimiento también influye, como es lógico, en la incidencia de recidivas que se describen en la bibliografía, con tasas que apenas alcanzan 11% cuando el seguimiento medio es inferior a 4 años ⁽²⁵⁵⁾, por lo que en nuestra serie procuramos un seguimiento mínimo de 5 años que alcanzó valores muy superiores en la mayoría de los casos.

Por otra parte, el ratio mujer/hombre se situó, al igual que en la bibliografía disponible, en 2,3:1 ^(6,7). También se describe una mayor prevalencia de varones con tumores de grados superiores, donde el clásico ratio superior de afectación femenina desaparece, lo que justifica que, de manera general, el sexo masculino se haya asociado con un peor pronóstico ^(143,292). De manera análoga, en nuestra serie, la evolución de los pacientes varones fue estadísticamente peor que la de las mujeres, con independencia del grado histológico de los tumores.

La evaluación inmunohistoquímica del potencial proliferativo de los meningiomas con el anticuerpo MIB-1/Ki-67 se ha considerado de utilidad para predecir el pronóstico de los pacientes. La valoración de Ki-67 puede hacerse en áreas seleccionadas por su alta frecuencia de núcleos positivos, en áreas seleccionadas al azar, o haciendo la media de todas las áreas del tumor ^(64,76). Las diferencias metodológicas para cuantificar este marcador justifican la gran variabilidad referida en la literatura ⁽³⁾ y que, a diferencia del número de mitosis, la valoración de Ki-67 no se encuentre entre los criterios de la OMS para establecer el grado tumoral ⁽⁴⁾.

En nuestro estudio, el índice de Ki-67 fue estadísticamente superior en los meningiomas de grado histológico II, tanto si analizamos el valor máximo que adquiere Ki-67 en las áreas de mayor actividad proliferativa, como si tomamos el valor promedio en la superficie analizada. Por otra parte, el número de mitosis en los meningiomas primarios de grado II también fue estadísticamente superior a los de grado I ⁽⁴⁾. Con respecto a la evolución, tanto el número de mitosis como los índices de Ki-67 medio y máximo se relacionaron estadísticamente con la tendencia a recidivar, en acuerdo con descripciones previas ^(62,64,70,272).

Para este estudio de marcadores de proliferación celular hemos utilizado TMAs, contruidos a partir de áreas representativas de las muestras tumorales, seleccionadas por el patólogo. Los TMAs son útiles para el estudio de material incluido en parafina; en ellas, se realizan las técnicas de laboratorio simultáneamente y de manera homogénea sobre conjuntos numerosos de muestras, lo que mejora la estandarización y reduce los

costes, en tiempo y reactivos consumidos ⁽²⁷⁸⁻²⁸⁰⁾; esto motivó su elección para, además de estudiar Ki-67 y el índice mitótico, evaluar con sondas FISH los cromosomas más implicados en meningiomas de cara a establecer patrones relacionados con la iniciación y progresión tumorales.

2 Caracterización genética de meningiomas primarios y meningiomas recidivados

Numerosos grupos han estudiado el perfil genético de los meningiomas, siendo las técnicas de citogenética las que hasta el momento han aportado los datos más concluyentes. No obstante, las metodologías moleculares que se han aplicado para elucidar los mecanismos moleculares implicados en estos tumores son muy diversas ^(100,231,253,258,292,293). En nuestro trabajo hemos abordado la caracterización genética de los meningiomas desde la citogenética clásica hasta el estudio molecular de diferentes genes supresores de tumor por MLPA. Esta caracterización se ha realizado tanto en meningiomas primarios como en meningiomas recidivados, estos últimos relativamente inexplorados en la bibliografía.

2.1 Citogenética convencional (cariotipo) y citogenética molecular (iFISH)

Para la obtención de resultados mediante los estudios de cariotipo es imprescindible el crecimiento "*in vitro*" de las células a estudiar. Las células tumorales procedentes de meningioma no se adaptan bien a las condiciones de cultivo "*in vitro*", sobre todo a largo plazo. Al igual que "*in vivo*", su crecimiento "*in vitro*" es relativamente lento. Como describen Lerner *et al.*, la obtención de una monocapa celular lleva entre 7 y 25 días de media ⁽²⁹⁴⁾, por lo que la obtención de metafases suficientes para realizar el cariotipo no es fácil. En nuestra casuística, se logró analizar el cariotipo en el 58,3% de las muestras incluidas en este proyecto.

Los meningiomas presentan una heterogeneidad citogenética importante con un rango variable que, según anteriores trabajos, se sitúa en un 33-60% diploidía-hipodiploidía ^(77,78), siendo la hiperdiploidía muy rara en estos tumores ^(21,78,129).

Nuestros resultados se ajustan a estos rangos; en casos aislados detectamos metafases triploides, tetraploides y poliploides.

La alteración cromosómica asociada de manera más consistente a los meningiomas es la monosomía total o parcial del cromosoma 22, cuya afectación oscila entre el 40 y el 80% de estos tumores en las diferentes series estudiadas ^(21,55,81,129,134). En nuestra casuística, el 45,7% de los casos mostraron alteraciones en este cromosoma. La afectación fue similar en los tumores primarios y en las recidivas, así como en los grupos de tumores de distintos grados histológicos, lo que incide en la importancia de este cromosoma en la tumorigénesis de los meningiomas ^(21,55,81,129,134).

La aplicación de la técnica de iFISH en la determinación del estado de 22q suele ofrecer una sensibilidad mayor que el estudio del cariotipo. En trabajos en que se comparan ambas técnicas en un mismo grupo de muestras, se describe una afectación un 20% superior al analizar el cromosoma 22 mediante iFISH, frente a la citogenética clásica ^(114,294). Aún así, la detección de esta alteración mediante iFISH también varía en las distintas series de la bibliografía consultada, con frecuencias de un 48,6% ⁽²⁶¹⁾, un 50-70% ^(69,261) o incluso un 83,3% ⁽¹¹⁴⁾. De manera similar, en nuestra serie detectamos alteraciones en 22q por iFISH en el 57,1% de las muestras, con afectación similar en los tumores primarios independientemente del grado. En las recidivas de meningioma las alteraciones del 22 fueron más frecuentes que en los tumores primarios, sin alcanzar significación estadística, si bien todas las recidivas de grado II-III mostraron pérdidas en este cromosoma.

La introducción de cambios secundarios se relacionan con la progresión hacia la malignidad en el meningioma. De ellos, la pérdida del brazo corto del cromosoma 1 es la segunda anomalía más habitual en meningiomas ^(21,90,103,111,114), lo que concuerda con nuestros datos. Los puntos de rotura más frecuentes son 1p11, 1p13-1p21, 1p22, 1p32-1p36 ^(118,151), al igual que en nuestros resultados; cabe destacar que el punto p11 se vio implicado en los 3 casos que presentaron translocaciones equilibradas entre los cromosomas 1 y 14.

La pérdida de material en 1p se detecta como alteración única ⁽¹²⁹⁾, o en asociación con otros cambios -generalmente la monosomía 22- en un tercio de los meningiomas ^(100,102,117). Nuestros hallazgos en el estudio cariotípico muestran, también, una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de parte de los brazos cortos

del cromosoma 1 y las alteraciones del cromosoma 22. En nuestra serie la afectación de 1p fue similar a la descrita en la bibliografía ^(21,69,105,114,118,150,261,272), si bien por iFISH se demostró una proporción de alteraciones 1,6 veces superior, lo que coincide con trabajos previos en que comparan la sensibilidad de la citogenética clásica y de la iFISH ⁽²⁹⁴⁾.

La distribución de pérdidas en 1p fue superior en las recidivas frente a los tumores primarios, sin alcanzar significación estadística. En los distintos grados histológicos la bibliografía ofrece resultados heterogéneos en los meningiomas de grado I ^(69,105,150,261,272,292), aunque es muy superior en los de grados II y III ^(105,150,292). De acuerdo con esto, en nuestra serie la frecuencia de alteraciones en 1p fue mayor en los tumores de grados superiores con el estudio por citogenética convencional (próximo a la significación estadística), pero su diferencia fue menos acusada al analizarlas mediante citogenética molecular (iFISH). Esta diferencia puede deberse a la valoración de células no tumorales en los TMAs, tales como las células inflamatorias.

Otro de los cromosomas más implicado en los meningiomas es el cromosoma 14. En torno al 18% de los meningiomas analizados presentaron alteraciones citogenéticas en el cromosoma 14; la más frecuente fue la monosomía total o parcial de este cromosoma, en acuerdo con descripciones previas ⁽¹¹⁴⁾ y los resultados obtenidos mediante iFISH confirmaron estos hallazgos ^(292,294). En la literatura consultada se describe una incidencia superior en las recidivas frente a tumores primarios, hecho que queda significativamente reflejado en nuestros resultados. De manera análoga, su afectación es más frecuente en meningiomas de grados II y III ^(69,90,163), lo que también ha sido confirmado significativamente en nuestra serie, por lo que se puede deducir que las pérdidas en el cromosoma 14 están relacionadas con la progresión tumoral del meningioma.

Además del análisis de los cromosomas más implicados en la iniciación y progresión de los meningiomas, el estudio del cariotipo proporcionó una visión conjunta sobre la inestabilidad cromosómica en este tumor y su gran heterogeneidad. Algunos autores detectan cariotipos más complejos en varones que en mujeres ^(111,114,129,131), hecho que justificaría la relación entre el sexo masculino y un pronóstico desfavorable. En nuestra serie se observa también esta relación, aunque sin alcanzar significación estadística, probablemente debido a la elevada proporción de meningiomas de grado I con

pronóstico desfavorable que, al ser más frecuentes en mujeres, aumenta la proporción de tumores con cariotipos complejos en ellas.

Las pérdidas más frecuentemente descritas, tras las de los cromosomas 1 y 14, afectan a los cromosomas 6, 10 y 18 ^(90,96,114,208,292), de manera análoga a lo que hallamos en esta tesis. Así mismo, tal y como sucede en la bibliografía consultada, en casi todos los cromosomas se han observado ocasionalmente cambios numéricos o estructurales ⁽⁴⁰⁾. En nuestro caso, la excepción fue el cromosoma 21, intacto en los 70 cariotipos analizados.

En el cromosoma 6 se han reportado tasas de afectación próximas al 15% ⁽¹¹⁴⁾ y Carvalho *et al.* las detectan en meningiomas con un alto potencial proliferante ⁽²⁰⁸⁾. En nuestro trabajo un único cariotipo presentaba monosomía 6, y otros 2 alteraciones estructurales de este cromosoma aunque, como discutiremos más adelante, las alteraciones en genes situados en este cromosoma fueron relativamente más frecuentes.

Las deleciones del cromosoma 10 (del10q-) aumentan con el grado histológico ^(90,96,170); por ello, se relacionan con un curso clínico agresivo ⁽¹⁶⁹⁾ aunque no se ha esclarecido si la agresividad es consecuencia de la pérdida cromosómica o del grado histológico del tumor ^(90,91,96,169,170). En nuestra casuística detectamos alteraciones en este cromosoma en un tumor primario y en dos recidivas, todos ellos de grados II y III.

Asimismo, se ha descrito el valor predictivo de las pérdidas en el cromosoma 18, que son más frecuentes en los tumores de grado II y III ^(114,292), de manera similar a nuestros resultados, en los que sólo uno de los cinco tumores con pérdidas en el cromosoma 18 era de grado I.

Especial mención merece la pérdida de un cromosoma sexual, descrita en un 42% de los casos con monosomía 22 y, con la mitad de frecuencia, en los casos con alteraciones concomitantes en el 22 y el 1 ⁽²¹⁾. En nuestro trabajo, las pérdidas de cromosomas sexuales se detectaron siempre asociadas a la monosomía 22, salvo en un caso en que también estaba implicado 1p, y su frecuencia fue próxima a la descrita por otros autores ⁽²⁹²⁾. Además, la pérdida de un gonosoma fue algo superior en los meningiomas recidivados que en los tumores primarios analizados.

2.2 Genes supresores de tumor en los cromosomas más frecuentemente implicados en la biología del meningioma: cromosomas 22, 1 y 14.

2.2.1 Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 22

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido identificar a *NF2* como el principal gen supresor de tumor, localizado en 22q12 e implicado en la oncogénesis del meningioma ^(145,191). El interés del análisis de *NF2* mediante MLPA radica en la posibilidad de estudiar simultáneamente los 17 exones del gen, lo que proporciona información detallada sobre su estado alélico. La principal ventaja que ofrece la MLPA es la sensibilidad, ya que analizamos regiones génicas muy concretas; cambios, incluso de un solo par de bases, pueden proporcionar una señal disminuida indicando pérdida de heterocigosidad (LOH), sea su origen una mutación puntual o sea una verdadera delección parcial.

La utilización de técnicas con un poder de resolución superior a la citogenética clásica y molecular, ha aumentado la proporción de meningiomas en que se detecta la implicación del cromosoma 22, concretamente del *locus* 22q12 y del gen *NF2* ^(143,145,147,148,176,180,208). En este sentido, la tasa de alteraciones determinada mediante MLPA, resulta ligeramente superior a las habitualmente descritas con otras técnicas basadas en PCR como son la secuenciación o el alelotipado ^(124,143), lo que pone de manifiesto su elevada sensibilidad.

Las alteraciones en *NF2*, aparte de ser evidentes en el síndrome de la Neurofibromatosis tipo 2, se han detectado en tumores cerebrales como los schwannomas y endimomas ^(180,191), y en otras neoplasias como los mesoteliomas ⁽¹⁴⁷⁾. Cabe mencionar que *NF2* no ha demostrado puntos calientes para su inactivación. De hecho, tanto en meningiomas como en pacientes con Neurofibromatosis de tipo 2, se encuentran todo tipo de mutaciones, pero las vías que llevan a la inactivación de este gen aún no han sido esclarecidas ⁽¹⁴⁷⁾. De aquí el interés por determinar los valores promedio de las diferentes regiones del gen (región de homología a proteínas 4.1 y región rica en α -hélice) para establecer diferentes subgrupos de tumores a estudiar.

Las pérdidas de *NF2* encontradas en nuestros casos fueron siempre en heterocigosis con una frecuencia global de deleciones similar a las descritas en otros trabajos con similares abordajes técnicos, tanto para el estado global del gen *NF2* como para la detección de deleciones parciales ^(194,275). En ningún caso detectamos pérdidas en

homocigosis de *NF2*, en coherencia con los hallazgos de otros autores ⁽²⁷⁵⁾. Este hecho sugiere la existencia de un segundo mecanismo inactivador según la hipótesis de Knudson ⁽²⁹⁵⁾, que llevaría a la pérdida de función de la proteína merlín. En nuestra serie se aprecia una mayor tasa de LOH en *NF2* en recidivas, con una afectación un 20% superior a la detectada en meningiomas primarios, y también un 13% superior en meningiomas grado II frente a los de grado I, aunque estas diferencias no alcanzaron significación estadística. Este hecho es similar a lo que se describe en otras series publicadas ^(124,190,258). Un hallazgo llamativo ha sido que las deleciones en la primera porción del gen han triplicado a las que afectaban a la parte terminal, tanto en los meningiomas primarios como en tumores recidivados; de hecho, en estos últimos, fue el único tipo de deleción parcial que se detectó.

Con respecto a los cambios en *NF2* en los distintos subtipos histológicos de meningiomas, el subtipo meningotelial muestra pérdidas con menor frecuencia que el resto de subtipos histológicos, entre el 25% y el 36% según las series publicadas ^(124,143,145). Estos valores se aproximan a los detectados en nuestro trabajo en meningiomas de grado I; no obstante, en nuestra serie en su totalidad, presentaron pérdidas en *NF2* la mitad de los meningiomas meningoteliales, lo que coincide con las descripciones de Kros *et al.* ⁽¹⁹⁶⁾. Los demás tipos histológicos presentaron tasas de alteraciones próximas al 70-80% de los casos, de acuerdo con descrito en la bibliografía consultada ⁽¹²⁴⁾. En el presente estudio, los tumores fibroblásticos fueron los más afectados, en los que se alcanzó un 90% de los casos. Cabe mencionar que los tumores angiomatoso, metaplásico y los secretores no presentaron en ningún caso pérdidas en *NF2*.

Las pérdidas totales o parciales del cromosoma 22 / *NF2*, resultan menos frecuentes en los tumores de la base del cráneo, con frecuencias del 23% al 40% ^(111,114); nuestros resultados se sitúan en este rango. Los tumores de la base del cráneo son habitualmente de histología meningotelial ^(124,185,196,231,296); este hecho apoya la teoría de una histogénesis diferencial para los tumores en esta localización, que desarrollaría una ruta de eventos genéticos independiente de *NF2* en buena parte de los casos ^(124,185,196,231,296). Es destacable que ninguno de los tumores de la fosa olfatoria mostró deleciones en *NF2*, lo que corrobora descripciones previas ⁽¹⁹⁶⁾.

El estado del cromosoma 22 se ha determinado mediante citogenética clásica, iFISH, y concretamente el gen *NF2*, mediante MLPA. El acuerdo entre las técnicas valorado mediante el estadístico Kappa de Cohen fue moderadamente bueno. No obstante, cabe comentar las diferencias detectadas con las distintas técnicas. Por un lado, encontramos 15 casos en los que la MLPA detectó deleciones en *NF2* que no detectaron las técnicas citogenéticas. Esto se puede atribuir a la resolución de las técnicas; una pérdida alélica no quedaría reflejada en el cariotipo, o puede ser pequeña para su detección mediante la sonda de FISH, mientras que la técnica de MLPA dispone de mayor sensibilidad, al estudiar el estado alélico exón a exón. Por otro lado, 4 casos mostraron pérdidas de material genético en el cromosoma 22 mediante citogenética que no pudieron ser detectadas por MLPA. Esta discrepancia podría atribuirse, o bien a un bajo contenido en células tumorales en la biopsia desde la que se extrajo ADN, o bien a la existencia de mosaico cromosómico, con una baja representación de la población con monosomía parcial o total del cromosoma 22. Si ajustamos el índice de concordancia a las discrepancias por déficit de sensibilidad mediante citogenética, obtenemos un índice Kappa de Cohen de 0,907, lo que implica un acuerdo excelente entre ambos tipos de técnica. Podemos concluir que la MLPA resulta una técnica eficaz y muy sensible ya que puede detectar alteraciones a nivel genético en casos en que no se ha producido alteración cromosómica.

El gen *TIMP3*, localizado en 22q12.3, codifica una proteína inhibidora de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), aunque es un candidato a gen supresor de tumor por mecanismos independientes a esta función. Encontramos LOH en *TIMP3* en una cuarta parte de los casos estudiados; fue significativamente superior en los tumores recidivados frente a los primarios y no mostró diferencias entre los distintos grados histológicos. Hasta donde sabemos, este hecho no está descrito en la bibliografía consultada, pero es coherente con las pérdidas que afectan al cromosoma 22 ya que en la práctica totalidad de los casos, las pérdidas en *TIMP3* estaban ligadas a la pérdida de un cromosoma 22 o del gen *NF2*; esto apoya la importancia del *locus* 22q12 en la oncogénesis de los meningiomas. Por otra parte, la pérdida de expresión mediante hipermetilación del promotor de *TIMP3* se ha referido en varios tipos tumorales como el glioblastoma secundario, el cáncer renal o el adenocarcinoma pancreático ^(297,298). Los niveles de hipermetilación en meningiomas, descritos en la bibliografía, apoyan la idea de que este evento se relacionaría con los tumores de grados II y III ^(239,240,261), aunque

para otros autores, la asociación no está clara ⁽²³⁷⁾. En nuestros casos, la hipermetilación fue superior en los meningiomas recidivados que en los primarios, pero el bajo número de casos con hipermetilación en *TIMP3* no permitió extraer resultados estadísticos. En todos ellos había alteración en el cromosoma 22, bien por pérdida de un cromosoma, bien por delección en 22q o bien por pérdida del gen *NF2*, de manera análoga a descripciones previas ⁽²⁴⁰⁾.

2.2.2 Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 1

En el brazo corto del cromosoma 1 se ha sugerido la presencia de varios genes supresores de tumor: *TP73*, *ALPL*, *hRAD54* y *CDKN2C* ^(299,300), lo que enfatiza la importancia de este cromosoma en la biología del meningioma. Hemos abordado su estudio mediante varias técnicas para perfilar las pérdidas detectadas. El estudio del *locus* 1p34 mediante MLPA proporcionó valores similares a la iFISH. Analizamos también la región más distal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36), en la que se localiza el supresor de tumor *TP73*.

TP73 es el principal candidato a supresor tumoral implicado en la biopatología de los meningiomas. Está relacionado estructural y funcionalmente con *TP53* y muestra funciones opuestas dependiendo del contexto biológico, de manera que puede actuar favoreciendo el crecimiento celular o induciendo la detención del ciclo ⁽²¹⁵⁾. Esta dualidad, así como las variaciones técnicas que emplean los diferentes trabajos sobre él, justificarían las divergencias halladas en la bibliografía ^(243,259,301).

La LOH descrita en *TP73* se sitúa en el 40% de los casos ⁽³⁰¹⁾, mientras que en nuestra serie las deleciones en este gen afectaron a la mitad de los meningiomas primarios analizados. En meningiomas recidivados el porcentaje fue algo superior. Cabe destacar que la mitad de las pérdidas de este gen las encontramos en homocigosis.

Hemos analizado el estado de metilación de este gen para conocer su posible inactivación mediante pérdida de un alelo y silenciamiento del otro ⁽²⁹⁵⁾. Trabajos previos postulan su implicación tanto en la génesis ^(239,243) como en la progresión tumoral de los meningiomas ⁽²⁴¹⁾. Con una metilación global próxima al 15% de los casos, sin diferencias significativas entre los diferentes grados histológicos, y con una incidencia ligeramente superior en recidivas frente a tumores primarios, nuestros

resultados apoyan los trabajos que sugieren que la alteración epigenética de *TP73* es un evento temprano en el proceso en múltiples pasos del desarrollo de los meningiomas (239,243).

2.2.3 Sobre las alteraciones moleculares en el cromosoma 14

El gen *MLH3* situado en 14q24.3, es un gen de reparación del ADN implicado en varios tipos tumorales y relacionado con la progresión tumoral (302,303). Hasta el momento no hay ninguna referencia bibliográfica en que se describa el estado alélico de *MLH3* en meningiomas. En nuestra serie, la LOH en *MLH3* se asoció estadísticamente con el grado histopatológico, tanto en el grupo de meningiomas primarios, como en los recidivados, en los que únicamente mostró LOH en las recidivas de grados II y III. Además, las alteraciones determinadas mediante citogenética (región 14q32) y/o mediante MLPA (14q13.2), fueron coherentes con este hallazgo, ya que se asociaron con LOH en el gen *MLH3* en más del 70%. Esto enfatiza la inestabilidad manifiesta del cromosoma 14 durante la progresión tumoral, y confirmaría hipótesis previas sobre la localización de genes potencialmente implicados en la biología del meningioma (164,302); así, *MLH3* se postula como un firme candidato a supresor tumoral en esta región.

Diferentes trabajos han aplicado la tecnología de MLPA sobre material incluido en parafina (262,277,304) si bien ninguno de ellos ha sido en este tipo tumoral. Las similitudes entre los resultados citogenéticos de los cromosomas 1, 14 y 22 y los proporcionados con las sondas de MLPA de *NF2*, 1p32, 1p36 (*TP73*), 14q13 y 14q24.3 (*MLH3*) incluidas en los kits utilizados, apoyan la validez de la MLPA para su uso en meningiomas fijados en formalina y embebidos en parafina.

2.3 Variación en número de copias y metilación de genes implicados en la biopatología de los meningiomas, situados en diversas regiones cromosómicas

La diversidad de cromosomas afectados en los meningiomas justifica la necesidad de explorar la presencia de TSG a lo largo de su genoma y los mecanismos de inactivación a que estarían sujetos. Trabajos previos con técnicas moleculares de alto rendimiento

muestran alteraciones en más de dos tercios de los meningiomas analizados ^(293,305), que afectan de media al 10% de las regiones analizadas en cada tumor ^(305,306), estos resultados son comparables a los nuestros, con una media de LOH aproximada de 5 genes por tumor al estudiar 38 regiones diferentes. Sin embargo, pocos investigadores han realizado este tipo de estudios sobre muestras tan importantes, en un servicio de Anatomía Patológica, como son las fijadas en formalina e incluidas en parafina ^(262,277,293,304) y, hasta la fecha, ninguno ha aplicado la MLPA en meningiomas sobre este tipo de material.

Nuestros resultados muestran que los genes supresores de tumor que con más frecuencia presentaron LOH, además del ya discutido *TP73*, fueron *ESR1* y *CDH13*, afectados en más de un tercio de las muestras. Cerca del 15% de los casos mostraron LOH en *HIC1*, *DAPK1*, *CD44* y *CASP8*. Los genes supresores de tumor *VHL*, *RARB*, *MLH1*, *RASSF1* y *FHIT*, del brazo corto del cromosoma 3, y *APC*, *CDKN2A* y *CDKN2B* y *GSTP1* presentaron LOH en alrededor de un 10% de los casos. Además, en nuestro estudio hallamos LOH en el gen *PTEN* que afectó únicamente a meningiomas recidivados.

Los mecanismos genéticos y moleculares subyacentes a las alteraciones epigenéticas, todavía no se conocen bien, pero las alteraciones que afectan a la metilación del ADN influyen en la génesis de numerosas neoplasias ^(234,307,308). El estudio del estado epigenético de genes supresores en tumores en los que todavía no se ha alcanzado una explicación genética para su evolución, es una herramienta potencial para mejorar la estratificación y afinar el pronóstico de los pacientes afectados ^(234,236). Trabajos previos en los que se analiza el estado de metilación de conjuntos de genes supresores de tumor en meningiomas, describen tasas de hipermetilación en al menos una de las regiones estudiadas en proporciones que van desde el 50% de los casos ⁽²³⁷⁾ hasta prácticamente el 100% ^(239,259), de manera similar a nuestros datos.

Los TSG que en más casos mostraron hipermetilación fueron *GSTP1* y *CDH13*. Entre un 10 y un 20% de los casos presentaron hipermetilación en *TP73*, *RASSF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *MLH1* y *PTEN* y un 5% de los casos en *ESR1*.

Desde esta perspectiva mixta sobre la inactivación mediante pérdida de heterocigosidad o hipermetilación de los genes supresores de tumor, y atendiendo a la frecuencia de LOH detectada en nuestra serie, analizamos nuestros resultados frente a la bibliografía disponible al respecto.

El gen *ESR1*, localizado en 6q25.1, codifica un factor de transcripción cuya unión con el ADN influye en la compactación de la cromatina y en diferentes modificaciones epigenéticas ⁽³⁰⁹⁾. La incidencia femenina de meningiomas y su crecimiento acelerado durante el embarazo, entre otros, han motivado diversos estudios sobre el papel de las hormonas esteroideas en el desarrollo de los meningiomas, aunque son múltiples las discrepancias sobre su función en este tipo tumoral ⁽³¹⁰⁾. Si bien ha sido ampliamente descrita la infrecuente expresión del receptor ER mediante detección de su ARNm o de la proteína, nada hay descrito sobre el estado alélico del gen en meningiomas. En nuestra serie detectamos LOH en más del 40% de los casos, sin diferencias entre grados ni entre tumores primarios y recidivas. Es interesante indicar que un gen analizado simultáneamente en la región 6q26, *PARK2*, mostró similares tasas de LOH. Codifica una E3 ubiquitin protein ligasa, de función concreta desconocida pero que participa en la señalización de proteínas para su degradación en el proteasoma. Al igual que *ESR1*, la distribución de alteraciones fue similar en tumores primarios y recidivas de meningioma, y también entre los diferentes grados histológicos.

En dos trabajos previos sobre la alteración epigenética de *ESR1* se describe que un 15-20% de los meningiomas analizados presentaron hipermetilación ^(239,276). En nuestra serie, detectamos una proporción ligeramente inferior, con una afectación mayor en las recidivas analizadas. Estadísticamente no observamos diferencias entre tumores de grado I y de grado II, al igual que en los mencionados trabajos ^(239,276). Cabe destacar que su metilación se asoció con la pérdida del cromosoma 22 y/o otras alteraciones del cariotipo, frecuentemente con la monosomía total o parcial del cromosoma 14, lo que sugiere que cambios en este gen se relacionarían con la progresión tumoral.

El gen *CDH13* localizado en 16q24.2, es un miembro de la familia de las cadherinas, que codifica una proteína transmembrana de adhesión celular. Aunque se trata de un gen que se ha visto infraexpresado en neoplasias como el cáncer de pulmón, ovario y próstata y generalmente se asocia con un pronóstico clínico desfavorable ⁽³¹¹⁻³¹³⁾, las consecuencias de su inactivación permanecen inexplicadas. El mecanismo de inactivación más frecuente es la hipermetilación. No hay referencias sobre la LOH en el meningioma; no obstante, se ha descrito LOH en similar proporción a las detectadas en este trabajo, en el linfoma de células B maligno ⁽³¹⁴⁾ y en el cáncer de ovario de alto

grado ⁽³¹²⁾. En nuestro estudio la proporción de LOH en *CDH13* fue similar en meningiomas primarios y en recidivados, y además en los meningiomas de grado I fue significativamente mayor que en los de grados superiores. A diferencia de Martínez-Glez *et al.*, que detectan hipermetilación de *CDH13* en meningiomas de manera esporádica ⁽³⁴⁾, en nuestra serie, alcanzó una quinta parte de los casos ⁽²⁵⁸⁾. La hipermetilación en *CDH13* se ha relacionado con una mayor capacidad invasiva en el adenoma de pituitaria ⁽³¹³⁾. Si bien en nuestros casos no encontramos diferencias entre los distintos grados, fue superior la hipermetilación en *CDH13* en las recidivas tumorales frente a los tumores primarios, aunque sin alcanzar significación estadística.

El gen *HIC1* localizado en 17p13.3, codifica un represor transcripcional implicado en la regulación del crecimiento celular, en las respuestas al daño en el ADN vía p53 y en la migración celular ⁽³¹⁵⁾. No encontramos referencias sobre la LOH en *HIC1* en meningiomas, y citogenéticamente está en una región poco alterada en estos tumores. No obstante, algunos trabajos detectan pérdidas en cerca de una cuarta parte de los casos mediante técnicas moleculares, como la aCGH ⁽⁹⁰⁾ o la RFLP ⁽³¹⁶⁾, lo que resulta muy similar a nuestros datos. Está más estudiada su alteración en otros tumores del SNC como los ependimomas y el meduloblastoma, en los que se asocia con tumores más agresivos ⁽³¹⁷⁾. En nuestra serie, este gen presentó deleciones significativamente más frecuentes en meningiomas recidivados que en primarios, si bien no mostró diferencias entre grados histológicos.

El gen *DAPK1*, localizado en 9p34.1 codifica un mediador de muerte celular programada inducida por interferón gamma. Hay varios trabajos en los que estudian su estado alélico por MLPA, con resultados dispares: ningún caso alterado en una serie de 15 casos ⁽²⁷⁶⁾, y un 21,5% en otra con 42 meningiomas ⁽²⁵⁸⁾. En este último trabajo, detectan un pequeño incremento de afectación en los tumores de grados superiores, de manera similar a nuestros resultados. En nuestra serie, la distribución de LOH en *DAPK1* fue similar en meningiomas primarios y recidivas. Aunque su hipermetilación se ha descrito en cáncer de ovario, pulmón o melanoma, en los que se asoció con el proceso de metástasis ⁽³¹⁸⁾, nada hay descrito en meningiomas; en nuestro estudio fue un evento aislado que detectamos en una sola recidiva.

El gen *CD44*, situado en 11p13, codifica el receptor de hialuronidato, que participa en las uniones célula-célula, e interacciona con la proteína merlín. Aunque se han estudiado

defectos en las proteínas que se unen a este receptor, no encontramos ningún trabajo sobre la LOH de este gen, como responsable de su déficit funcional en ningún tipo tumoral. No obstante, la expresión inmunohistoquímica de *CD44* en meningiomas parece relacionarse con un peor pronóstico ⁽³¹⁹⁾. En nuestra casuística encontramos LOH en *CD44* en un pequeño porcentaje de casos, sin diferencias entre los tumores de grado I y grado II, ni entre tumores primarios y recidivas. La hipermetilación en este gen se detectó de manera esporádica, al igual que en trabajos previos ⁽²⁵⁸⁾.

El gen *CASP8* localizado en 2q33-2q34, es un regulador de la muerte celular programada y, por tanto, clave en la defensa contra el cáncer. Aunque en nuestro estudio el porcentaje de deleciones no mostró diferencias entre tumores primarios y recidivas, fue mayor en los meningiomas de grados superiores (sin alcanzar significación estadística), lo que podría sugerir cierta asociación con un potencial agresivo superior. Esporádicamente, sólo 2 casos de la serie, mostraron hipermetilación de su promotor, de manera similar a lo descrito en la bibliografía. ⁽²⁵⁸⁾

El análisis mediante aCGH ha evidenciado pérdidas en 3p en más del 20% de los meningiomas ⁽²⁰⁸⁾, dato acorde a las pérdidas en *CTNNB1* (3p22.1), aunque superior a nuestros hallazgos en la VNC de *VHL* (3p25.3), *FHIT* (3p14.2), *RASSF1* (3p21.31) y *MLH1* (3p22.2). Del gen *CTNNB1* no está clara la función como supresor de tumor; su interacción con la E-cadherina y su papel en la vía Wnt enfatizan el interés de su análisis en meningiomas. La frecuencia de pérdidas en nuestros casos también concuerda con los datos de pérdida de expresión proteica descritos por Brunner *et al.* ⁽¹¹⁴⁾ y, al igual que en ese trabajo, su pérdida se asoció estadísticamente a los meningiomas de grados superiores. La LOH en *VHL*, que codifica una E3 ubiquitin ligasa y *FHIT*, que codifica una adenilhidrolasa que participa en el metabolismo de las purinas, afectó a menos del 5% de los casos. Ninguno de ellos mostró diferencias significativas entre tumores primarios y recidivas ni entre grados histológicos. *RASSF1* codifica una proteína de la familia de proteínas de asociación al dominio RAS que participa en la proliferación celular, la apoptosis y la adhesión celular y *MLH1* es un gen de reparación del ADN; ambos presentaron LOH en cerca del 10% de los meningiomas analizados. Cabe señalar que los meningiomas primarios analizados que mostraron LOH en *RASSF1* y *FHIT* eran exclusivamente de grado I.

De estos genes, estudiamos el estado de metilación de *MLH1* y *RASSF1*. *MLH1* se observó significativamente más hipermetilado en los tumores primarios de grado I, aunque no mostró diferencias entre primarios y recidivas; un único trabajo previo describe, a diferencia de nuestro estudio, que la hipermetilación en *MLH1* se asoció a grados superiores ⁽³²⁰⁾. La elevada proporción de meningiomas grado I clínicamente agresivos en esta serie, podría ser responsable de este desacuerdo. La situación inversa se dio en *RASSF1*, en los que el grado de metilación fue similar en los distintos grados histológicos, pero significativamente superior en recidivas frente a meningiomas primarios. En la bibliografía consultada se refiere que la hipermetilación de *RASSF1* se asocia con meningiomas de alto grado, en los que se detecta hasta en el 50% de los casos ⁽²⁴¹⁾; esta diferencia puede deberse al reducido número de meningiomas malignos analizados. Otro trabajo describe una hipermetilación inferior al 20%, sin diferencias entre grados ^(245,258), lo que coincide con nuestros resultados.

El gen *APC*, localizado en 5q21, es un regulador negativo de la ruta de señalización Wnt, relacionada con la tumorigénesis en neoplasias cerebrales ⁽¹⁷²⁾. Su pérdida de función, lleva a la acumulación de β -catenina, que se transloca al núcleo conduciendo a la desregulación de esta vía de señalización. Se ha descrito su mutación, LOH e hipermetilación en otras neoplasias, pero su estado alélico en el meningioma está poco estudiado ⁽¹¹⁵⁾. Se ha descrito una frecuencia de LOH doble a la detectada por nosotros; esta diferencia podría deberse a que analizamos distintos exones. No hallamos diferencias entre grados ni entre tumores primarios y recidivas. La hipermetilación en este gen fue un evento infrecuente que observamos en sólo 3 casos.

Los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, situados en 9p21 regulan la transición de fase G1/S del ciclo celular. Su inactivación permite la proliferación celular descontrolada y favorece la evasión de la apoptosis ⁽¹⁰⁰⁾. Las alteraciones en este *locus* no afectan extensamente a los meningiomas; este hecho sugiere que no desempeñan un papel importante en la progresión de estos tumores si bien se describe un aumento de afectación en los meningiomas de grados superiores, que de manera global, ronda el 10% de los casos ^(100,261). En nuestro caso, la frecuencia de LOH fue significativamente superior en las recidivas frente a los meningiomas primarios, lo que señala la acumulación de alteraciones en genes de control del ciclo celular con el tiempo.

Por otro lado, detectamos hipermetilación en *CDKN2A* en un 10% de los casos, sin diferencias significativas en función del grado, ni entre tumores primarios y recidivas; Amatya *et al.* detectan una elevada frecuencia en meningiomas anaplásicos, pero dado que en nuestra serie un único meningioma era de grado III no podemos establecer ninguna relación ⁽²²³⁾. La proporción de casos afectados en nuestra serie fue superior a la referida por Aydemir *et al.* que detectan hipermetilación en *CDKN2A* en meningiomas de grado II, y no la hallan en meningiomas de grado I ⁽²⁴⁹⁾, probablemente por el tamaño de la muestra ya que solo analizan 3 meningiomas de grado I cuyos pacientes sufrieron recidivas. Se encontró un porcentaje similar de casos con hipermetilación en *CDKN2B* ⁽²⁵⁸⁾, con una incidencia ligeramente superior en meningiomas de grado II que no alcanzó significación estadística. La hipermetilación de estos genes en recidivas sí que fue significativamente mayor que en los tumores primarios.

El gen *GSTP1*, localizado en 11q13, participa en procesos de detoxificación, por lo que previene indirectamente de daños en el ADN ^(234,249). Los polimorfismos en este gen se han relacionado con el riesgo de desarrollar tumores del SNC ⁽²⁶⁰⁾, aunque hay pocas referencias sobre su estado alélico en meningiomas. Se ha descrito expresión inmunohistoquímica de *GSTP1* en meningiomas meningoteliales y su ausencia en fibroblásticos, lo que podría sugerir un origen biológico diferente entre ambos subtipos histológicos ⁽³²¹⁾. En nuestra serie no detectamos estas diferencias, si bien cabe destacar que dentro de los tumores primarios únicamente encontramos LOH en *GSTP1* en los meningiomas de grado I. No hallamos diferencias entre tumores primarios y recidivas.

GSTP1 fue el gen que con mayor frecuencia presentó hipermetilación (25% de los casos), muy similar a las proporciones descritas en trabajos previos ^(237,258). En nuestra serie, a diferencia de en los mencionados trabajos, no hubo asociación con el grado histológico de los tumores, ni diferencias significativas entre tumores primarios y recidivas aunque, como discutiremos posteriormente, sí que fue relevante su relación con la tendencia a recidivar en meningiomas histológicamente benignos.

El gen *PTEN* situado en 10q23.31 está mutado en un amplio número de cánceres; actúa como supresor tumoral regulando negativamente los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato y la ruta de señalización de las MAPK ⁽⁵³⁾. La LOH en este gen es muy infrecuente en meningiomas y se ha descrito en pocos casos en la

bibliografía consultada ^(222,276); en acuerdo con esto, en nuestra serie solo 4 casos, todos ellos recidivas, mostraron LOH en *PTEN*.

Sorprendentemente, detectamos hipermetilación en *PTEN* en cerca del 10% de los casos, sin diferencias entre meningiomas primarios y recidivas, pero con mayor frecuencia en los tumores primarios benignos que en los de grados superiores. Esta frecuencia es superior a la referida por Martínez-Glez *et al.* que la detecta en solo uno de 42 meningiomas ⁽²⁵⁸⁾.

Además de estos genes supresores de tumor, cuatro genes: *CELF2*, *CREM*, *PAH*, y *BCL2*, han sufrido LOH en más del 20% de los casos.

CELF2, localizado en 10p14, codifica una proteína involucrada en la edición de los ARNm y la apoptosis. Este gen se ha visto implicado en el neuroblastoma y en la respuesta a la radioterapia en cáncer de mama ⁽³²²⁾. Detectamos LOH en un porcentaje importante de los casos, y se ha mostrado más alterado en meningiomas primarios de grado II, sin mostrar diferencias entre tumores primarios y recidivas. Aunque no hemos encontrado referencias bibliográficas sobre este gen, nuestros resultados son coherentes con las pérdidas descritas en 10p, que se relacionan con grados histológicos superiores ^(90,169).

El gen *CREM* (10p11.21), codifica una proteína de unión en respuesta a AMPc y tiene actividad como factor de transcripción, que participa en la neoangiogénesis. Hasta donde sabemos, no hay nada publicado sobre su silenciamiento en el cáncer. No obstante, se ha descrito un incremento en el riesgo de desarrollar meningiomas por polimorfismos en 10p12.31, y se sugiere la existencia de múltiples regiones en 10p que podrían estar implicadas en la biología del meningioma ^(169,323). Llama la atención que, a pesar de la baja frecuencia de LOH detectada en *CREM*, fue significativamente superior en los meningiomas primarios de grado II-III.

Aunque no se conoce el papel del gen de la fenilalanina hidroxilasa (*PAH*) localizado en 12q22-q24.2, en el desarrollo tumoral, se ha reportado la pérdida en 12q en aproximadamente el 50% de los meningiomas de grado II ⁽⁹⁰⁾. En este trabajo encontramos resultados similares de LOH en *PAH*. A pesar de que también detectamos pérdidas en meningiomas de grado I, éstas fueron significativamente más frecuentes en los meningiomas de grados superiores.

Las pérdidas alélicas en el cromosoma 18 en los meningiomas, han mostrado cierto valor predictivo ya que son más frecuentes en los tumores de grado II y III ^(114,292). En nuestra serie hemos analizado el gen *BCL2* localizado en 18q21.3, que ha demostrado resultados controvertidos en otras neoplasias. Estudios inmunohistoquímicos muestran en unos casos la asociación de una mayor expresión con peor pronóstico y viceversa ⁽³²⁴⁾, lo que sugiere que su papel como oncogén no es tan evidente y podría tener propiedades supresoras de tumor, o incluso una función dual en función del contexto biológico, como ocurre en el caso de *TP73*. En nuestros casos no ha mostrado diferencias significativas entre grados histológicos, aunque su afectación fue aparentemente superior en meningiomas de grado II. La LOH de *BCL2* fue significativamente superior en las recidivas de meningioma analizadas, lo que remarca la inestabilidad del cromosoma 18 durante la progresión de la enfermedad.

La caracterización citogenética, genética y epigenética de los meningiomas primarios y recidivas analizados, así como el estudio de las diferencias en función del grado histológico en meningiomas primarios, ha proporcionado una gran cantidad de información que resumimos a continuación.

La citogenética clásica ha demostrado, desde hace años, que las alteraciones más frecuentes en meningiomas son las pérdidas cromosómicas, por ello es de suponer que, a nivel molecular, diferentes genes supresores de tumor deben jugar un papel importante en la iniciación y progresión de estos tumores. Incluso las alteraciones en el cromosoma 22, aun tratándose de un evento iniciador, aumentan su incidencia en las recidivas tumorales, en acuerdo con descripciones previas ⁽²³¹⁾. Ocurre igualmente con las pérdidas detectadas en 1p y 14q, más aún cuando las determinamos mediante técnicas moleculares, más resolutivas que la citogenética convencional.

Al hacer un análisis pormenorizado de las deleciones de todos los genes supresores de tumor incluidos en nuestro estudio, observamos que la LOH en los genes *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN* y *HIC1* es significativamente más frecuente en meningiomas recidivados que en los primarios. *TIMP3* también mostró esta tendencia sin alcanzar significancia. Es interesante el hecho de que *HIC1*, *CDKN2A* y *PTEN* están implicados en la apoptosis vía P53 y/o vía mTOR y regulan la proliferación celular. Por otro lado, cabe señalar que aunque sin diferencias estadísticamente significativas, fue más frecuente en los tumores

recidivados la LOH en *TP73*, *CDH13*, *PARK2*, *CELF2*, implicados también en los procesos de apoptosis, y *ESR1*, *TSC2* y *DAPK1*, todos ellos reguladores de la proliferación celular. Además, las alteraciones en *DAPK1* y en *PTEN* se relacionan con la neoangiogénesis tumoral, necesarias para la progresión tumoral.

Un hecho destacable ha sido que, más allá de los genes concretos que se ven alterados, el número de genes con pérdida de heterocigosidad fue estadísticamente superior en los meningiomas recidivados que en los primarios, y además las pérdidas en homocigosis fueron el doble de frecuentes en los recidivados, sugiriendo una importante inactivación de genes supresores de tumor, en los meningiomas que han manifestado un comportamiento más agresivo.

El estudio de la metilación proporcionó unos resultados similares: los casos que presentaron tres o más TSG hipermetilados fueron tres veces más frecuentes en los meningiomas recidivados. La inactivación de *RASSF1* y *ESR1* por hipermetilación fue significativamente más frecuente en las recidivas. La pérdida de función de *RASSF1*, se relaciona además con la formación de nuevos vasos vía NFκβ. Además, fueron superiores aunque sin alcanzar significación estadística, los cambios epigenéticos en *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN*, *MLH1* y, en menor medida, en *GSTP1* y *CDH13*. Así, los cambios genéticos y epigenéticos en estos meningiomas tendrían un efecto aditivo durante la progresión tumoral, afectando principalmente a tres de los sellos del cáncer, ya que favorecen la evasión de la apoptosis por parte de las células tumorales y promueven la proliferación descontrolada y los procesos de neoangiogénesis.

Dentro de los meningiomas primarios, en función del grado histológico, la pérdida de heterocigosidad de genes concretos ha demostrado diferencias entre los meningiomas de grado I y de grados superiores con una mayor afectación en los segundos, en los genes *CTNNB1*, *PARK2*, *MLH3*, *CREM* y *PAH*, lo que evidencia cambios genéticos que influirían en último término en las características histológicas, que permiten, desde el análisis anatomopatológico, prever la diferente agresividad que mostrarán los tumores. Mientras los 3 primeros influirían en el descontrol de la apoptosis, el gen *CREM* se relacionaría con el mantenimiento de una angiogénesis sostenida. La LOH en *CDH13* fue la única significativamente más habitual en los meningiomas primarios de histología benigna; aunque en principio este hallazgo se opone a descripciones previas sobre la

alteración de este gen, que parece relacionarse con la agresividad tumoral en otras neoplasias ⁽³¹¹⁻³¹³⁾, esta alta afectación parece deberse a la elevada proporción de meningiomas benignos con evolución desfavorable en nuestra serie, ya que como comentaremos más adelante, su implicación fue superior en los meningiomas de grado I que presentaron recidivas tumorales. Por otra parte, los cambios epigenéticos fueron similares con independencia del grado histológico, a excepción de *MLH1*, significativamente más hipermetilado en meningiomas benignos, que al igual que en el caso anterior, se debería a la elevada proporción de meningiomas grado I clínicamente agresivos recogidos en este trabajo.

Todas estas características genéticas en un tumor de comportamiento benigno, cuya principal complicación es la capacidad de recidivar, indicarían que esa transformación hacia la agresividad, más que depender de un cambio génico concreto, a diferencia de otros tumores sólidos como el carcinoma papilar de tiroides, en el que las mutaciones en *BRAF* se asocian con la aparición de recidivas ⁽³²⁵⁾ en el meningioma, estaría relacionada con una inestabilidad genómica donde la acumulación de cambios induciría un fenotipo más agresivo del tumor. Con respecto a este hecho, en este trabajo hemos observado que el gen *MLH3* está alterado a nivel de LOH; su localización en el cromosoma 14, implicado en meningiomas en los grados más agresivos del tumor, enfatiza su posible papel como gen supresor tumoral en esta neoplasia. Además, la hipermetilación en *MLH1*, superior en los meningiomas de grado I, incide en la importancia de los defectos en los mecanismos de reparación del ADN en la evolución de los meningiomas, con alteraciones en dos genes implicados en estos procesos, inactivados por diferentes mecanismos.

3 Perfil genético-molecular en meningiomas primarios que han recidivado frente a meningiomas que no han recidivado

A nivel citogenético los cambios cromosómicos que afectan a los cromosomas 1 y 14, preferentemente cuando ambos coexisten, aparecen en meningiomas de grado I que recidivan, incluso después de la exéresis completa del tumor ^(69,104,271). En este sentido,

el estudio de iFISH en nuestra serie, mostró la pérdida del cromosoma 14 acompañada de la delección 1p en 6 casos, y de ellos, recidivaron 4.

En esta casuística, las alteraciones en 1p fueron más frecuentes en los meningiomas benignos que recidivaron frente a aquellos que no presentaron recidivas, en acuerdo con descripciones previas ^(69,261). Sin embargo, con respecto al cromosoma 14 no hemos visto esta discriminación. Pero lo más destacable desde el punto de vista citogenético en este trabajo es que, en el grupo de meningiomas benignos que evolucionaron desfavorablemente, detectamos un incremento en la complejidad del cariotipo, incluyendo una importante afectación de los gonosomas. Si bien esta acumulación de alteraciones cromosómicas se ha relacionado con los meningiomas de grados II y III ^(118,292), su detección es coherente también en los tumores de grado I clínicamente agresivos. Estos defectos cromosómicos evidencian una pérdida de control sobre la regulación del ciclo celular y la segregación cromosómica, que supondría una ventaja selectiva para las células tumorales, permitiendo la progresión de la enfermedad. Además, detectamos una LOH significativamente superior en 4q27, en los meningiomas benignos que recidivaron, hecho que no hemos encontrado en la bibliografía revisada; en la misma banda cromosómica se sitúa el gen *MAD2* cuya pérdida se relaciona con la presencia de aneuploidía en células tumorales, favoreciendo la inestabilidad cromosómica ⁽³²⁶⁾.

Cuando analizamos la VNC en los tumores primarios de grado I que recidivaron frente a los que no lo hicieron, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de LOH, ni de manera global ni en genes supresores de tumor concretos; no obstante, se observan pérdidas frecuentes en los genes *TP73*, *ESR1*, *CDH13* y *PARK2*, que son más patentes en los tumores de grado I que recidivaron. Si bien a nivel génico no es amplia la literatura sobre estos genes, a excepción del ya comentado *TP73*, cabe señalar que la LOH descrita en 6q, donde se localizan *ESR1* y *PARK2*, alcanza el 26% de los casos, relacionándose con tumores de grados II-III ^(208,271,293) lo que representa, al fin y al cabo, una alteración en meningiomas con fenotipos más agresivos. De igual manera ocurre con *CDH13* situado en 16q; un trabajo previo identifica la infraexpresión de *ICSBP1*, situado también en 16q24.1, como segundo cambio más significativo en

meningiomas atípicos y anaplásicos, lo que sugiere, al igual que nuestros datos, que 16q24 es un *locus* importante en la biopatología de los meningiomas ⁽²⁵⁶⁾.

Como ya hemos comentado, *TP73* está implicado en las vías de evasión de la apoptosis y sus defectos se han relacionado tanto con la iniciación como con la progresión tumoral en meningiomas. Trabajos previos señalan la asociación entre el silenciamiento de *TP73* y la presencia de alteraciones en el cromosoma 1 en tumores atípicos y anaplásicos ⁽²⁴¹⁾ lo que apoya su relación con un incremento en la agresividad biológica, coherente con la frecuencia de alteraciones que detectamos al analizar la cohorte de meningiomas benignos que recidivaron.

Los cambios epigenéticos han demostrado su relevancia en la oncogénesis de multitud de neoplasias. Se ha propuesto la existencia de perfiles de hipermetilación que definirían cada tipo tumoral, lo que ha llevado a diferentes grupos a tratar de definir estos patrones ^(234,236,249,277,307-309,327). En nuestro trabajo, el perfil epigenético de los meningiomas histológicamente benignos que recidivaron resultó sustancialmente distinto al de aquellos tumores que no recidivaron: la hipermetilación fue significativamente más frecuente en *RASSF1*, *MLH1* y *CDKN2B*, genes con función en la inducción de la apoptosis, la reparación del ADN y la transición de fase G1/S en el ciclo celular, en los tumores que recidivaron. Además, la hipermetilación en *GSTP1*, *CDH13*, *TP73*, *CDKN2A* y *PTEN*, implicados también en la respuesta a daños en el ADN, el control del ciclo celular, los mecanismos de adhesión y la vía PI3k-AKT, fue aparentemente superior en ellos, ayudando a completar el perfil-epigenético de meningiomas de grado I que recidivaron. Pero lo más relevante es que el perfil epigenético de los meningiomas primarios que recidivaron resultó similar al que mostraron las recidivas tumorales analizadas (figura 47), con hipermetilación frecuente en ambos grupos en los genes *RASSF1*, *MLH1*, *GSTP1*, *CDKN2A/2B*, *PTEN* y *CDH13*, lo que promovería la evasión de la apoptosis y la proliferación celular descontrolada.

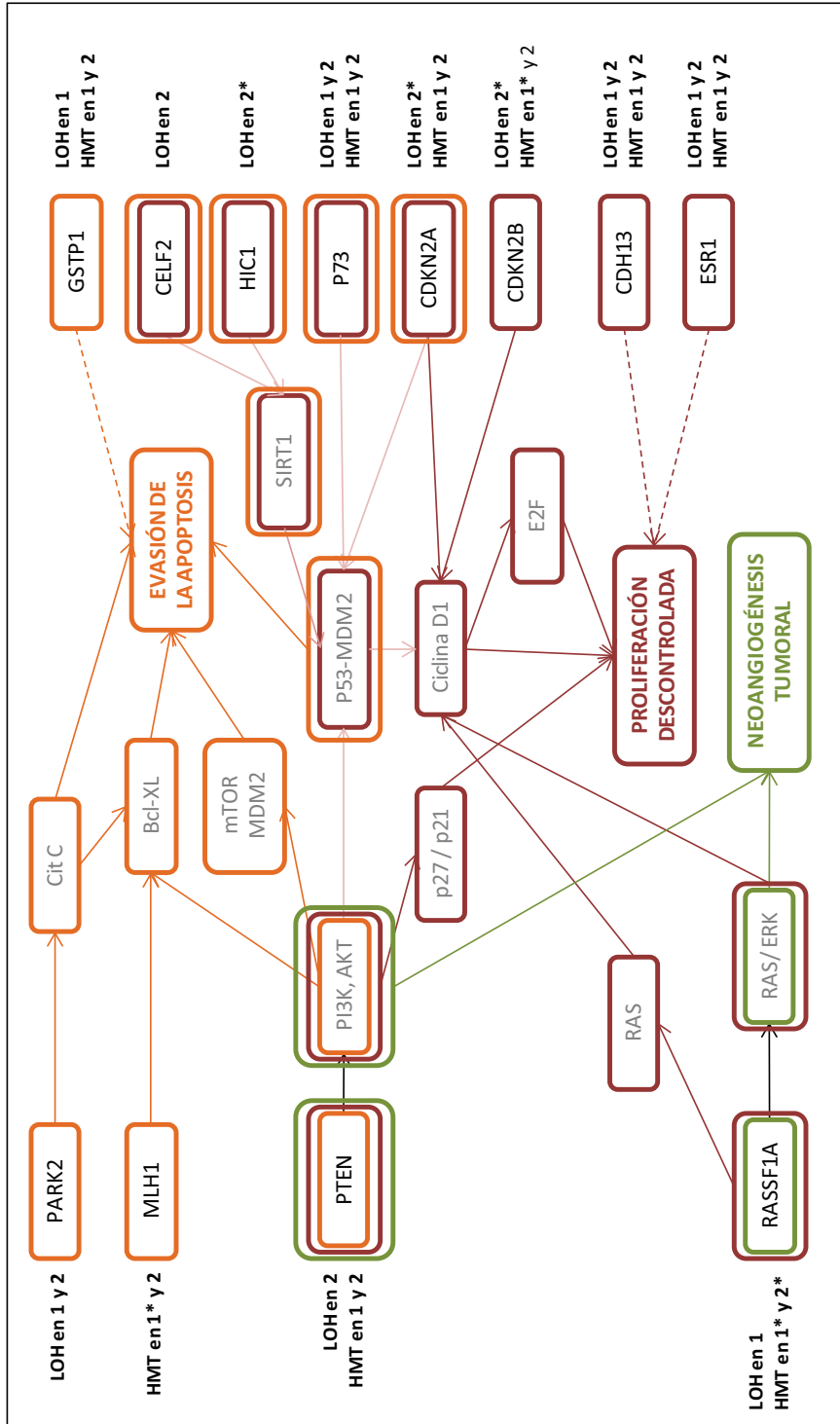


Figura 47. Genes supresores de tumor cuya hipermetilación fue más similar en meningiomas primarios de grado I que recidivaron y en recidivas de meningiomas. 1, meningiomas de grado I que recidivaron; 2, meningiomas recidivados; * diferencias estadísticamente significativas con (1) tumores primarios de grado I que no recidivaron y (2) con tumores primarios.

El estudio de las recidivas de meningioma es interesante como ejemplo de tumor que ha sufrido progresión tumoral y que ha ido incorporando durante esa progresión, diferentes cambios génicos, cromosómicos y epigenéticos, que le confieren una ventaja selectiva. La búsqueda de analogías entre los meningiomas primarios de grado I que recidivaron durante el tiempo de estudio y la cohorte de tumores recidivados analizados, nos permite proponer marcas genéticas y epigenéticas de agresividad que resultan evidentes en el tumor recidivado y cuya presencia en el primario constituye un signo probable de agresividad biológica intrínseca.

Todos estos hallazgos sugerirían que la pérdida de control sobre el ciclo celular en los tumores primarios histológicamente benignos que evolucionan recidivando, podría deberse a cambios epigenéticos en diversos genes supresores de tumor. Sería durante la evolución tumoral, cuando se produciría un incremento en el número de pérdidas alélicas en genes supresores de tumor, tal y como hemos observado en el análisis genético de las recidivas. Esta pérdida de control, que favorece la evasión de la apoptosis, unido a los defectos en los mecanismos de reparación del ADN y a un aumento de la proliferación celular, es coherente con la acumulación de alteraciones cromosómicas en las formas más agresivas del tumor, que se traducen en un incremento de la complejidad cariotípica, como viene describiéndose tradicionalmente mediante citogenética convencional en el meningioma.

El paralelismo hallado entre meningiomas de grado I que recidivan, y recidivas tumorales, en los genes supresores de tumor que sufren LOH o presentan hipermetilación, ofrece una visión más completa de las vías de progresión del meningioma. La variabilidad de *loci* génicos que se ven implicados, es un reflejo contundente de la gran heterogeneidad a todos los niveles que presentan estos tumores. Si bien el análisis mediante MLPA de un número mayor de casos podría permitir establecer cuáles son las dianas génicas más idóneas para poder construir modelos matemáticos predictivos, que es en último término, la finalidad de la traslación de la investigación básica, nuestros resultados inciden en la desregulación de las vías de proliferación celular, apoptosis y aunque en menor medida, neoangiogénesis tumoral. Este hecho pone de manifiesto el interés de analizar en profundidad estas vías para buscar puntos comunes en ellas en los que poder detectar las consecuencias a nivel

proteico de la desregulación funcional originada por la pérdida de actividad que puede producirse en los productos codificados por *TP73*, *MLH1*, *RASSF1*, *ESR1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN*, *GSTP1* o *CDH13* entre otros. Así, sería interesante explorar el efecto de estas alteraciones, por ejemplo, sobre la expresión génica de la Ciclina D1, situada de manera central en todas las vías de proliferación afectadas, y AKT/fosfo-AKT, como punto de conexión entre las alteraciones en *PTEN* y la vía mTOR. Lograr aunar las consecuencias de la LOH y la hipermetilación sobre más de 20 genes, reflejada en variaciones de un número reducido de proteínas, podría permitir perfilar de manera relativamente sencilla, qué tumores, dentro de aquellos con histología benigna, tendrían un riesgo incrementado de sufrir recidivas tumorales.

CONCLUSIONES

Del estudio clínico, histopatológico, citogenético y molecular en 120 meningiomas analizados se extraen las siguientes conclusiones:

1. De las características clínicas de los 101 pacientes, la radicalidad de la cirugía, el tamaño tumoral y el sexo masculino fueron los parámetros que más se asociaron con la aparición de recidivas.

2. De las características histopatológicas, el grado y los índices proliferativos fueron los parámetros más diferenciadores entre tumores primarios y recidivas, siendo los grados II y III y el elevado potencial proliferativo más frecuentes en las recidivas tumorales.

3. Los meningiomas son tumores citogenéticamente muy heterogéneos. La complejidad cariotípica aumenta significativamente con el grado histológico y es mucho más patente en las recidivas analizadas.

4. Las alteraciones del cromosoma 22 afectaron aproximadamente a la mitad de los meningiomas, sin diferencias entre los grupos estudiados y se confirman como evento iniciador en la tumorigénesis del meningioma.

5. Las alteraciones de los cromosomas 1p y 14q son más frecuentes en meningiomas de grados II y III, así como en recidivas frente a tumores primarios, lo que sugiere que la pérdida de genes supresores de tumor situados en estos cromosomas, desempeña un papel importante en la agresividad del meningioma.

6. Las alteraciones en *NF2* no presentan diferencias entre tumores primarios y recidivas, ni en función del grado histológico del tumor. Esto apoya la idea de que es una alteración implicada en la iniciación tumoral. Los primeros exones del gen son los que antes sufren LOH en todos los grupos analizados. La LOH en *NF2* es menos frecuente en meningiomas meningoteliales y en tumores de la base del cráneo, lo que sugiere una oncogénesis diferencial en estos casos.

7. El estudio de la VNC mediante MLPA manifiesta pérdidas de heterocigosidad de genes supresores de tumor, estadísticamente superiores en recidivas frente a tumores primarios. Las pérdidas en homocigosis son el doble de frecuentes en las primeras.

8. Los genes supresores de tumor más frecuentemente delecionados en este estudio fueron *TP73*, *ESR1* y *CDH13*. Los dos primeros se vieron afectados en tumores primarios y en recidivas, pero en estas últimas se detecta además, LOH significativamente superior

en *CDKN2A*, *CDKN2B*, y *PTEN*, genes directamente relacionados con la agresividad tumoral.

9. Las alteraciones epigenéticas en TSG son frecuentes en los meningiomas; en este estudio los genes *GSTP1*, *CDH13* y *RASSF1* fueron los más frecuentemente hipermetilados. Las recidivas muestran una frecuencia de hipermetilación estadísticamente superior a la de los tumores primarios; los genes *RASSF1* y *ESR1* son los más afectados en las recidivas.

10. Los meningiomas primarios que recidivaron, con independencia del grado, presentaron estadísticamente mayores tamaños tumorales, índices de proliferación superiores, pérdidas de un gonosoma, y un mayor número de genes supresores de tumor inactivados epigenéticamente que aquellos meningiomas que no recidivaron.

11. Los meningiomas de grado I que recidivaron mostraron índices proliferativos superiores, mayor complejidad cariotípica, y mayores frecuencias de pérdidas en 1p34 y 4q27 que los meningiomas de grado I que no recidivaron.

12. Con respecto a los meningiomas de grado II que recidivaron, sólo las pérdidas del cromosoma 14 fueron estadísticamente superiores en ellos, frente a los meningiomas de grado II que no recidivaron.

13. Con respecto a la inactivación epigenética de genes supresores de tumor, fue superior en meningiomas de grado I que recidivaron de manera global; los genes *MLH1*, *CDKN2B* y *RASSF1* estaban significativamente más implicados, incidiendo en los defectos en los mecanismos de reparación del ADN.

14. El perfil epigenético de los meningiomas de grado I que recidivaron muestra importantes similitudes con el perfil epigenético de las recidivas tumorales analizadas, manifestando un sello epigenético característico de una agresividad biológica intrínseca incrementada en estos tumores.

15. Las características genéticas que describimos en un tumor habitualmente benigno como es el meningioma, indican que, a diferencia de otros tumores sólidos, la transformación hacia la malignidad, no depende tanto de cambios génicos concretos sino que se relaciona con un aumento global en la inestabilidad genómica, donde la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos induciría un fenotipo más agresivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cushing H. The meningiomas (dural endotheliomas): their source, and favoured seats of origin. *Brain* 1922; **45**: 282-316.
2. Cushing H. Meningiomas : their classification, regional behaviour, life history, and surgical end results. Springfield: Charles C. Thomas; 1938.
3. Lee JH. Meningiomas : diagnosis, treatment, and outcome. London: Springer; 2008.
4. Louis DN. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007.
5. Cormack DH. Essential histology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
6. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, *et al*. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol* 2014; **16** Suppl 4: 1-63.
7. Klaeboe L, Lonn S, Scheie D, Auvinen A, Christensen HC, Feychting M, *et al*. Incidence of intracranial meningiomas in Denmark, Finland, Norway and Sweden, 1968-1997. *Int J Cancer* 2005; **117**: 996-1001.
8. Elia-Pasquet S, Provost D, Jaffre A, Loiseau H, Vital A, Kantor G, *et al*. Incidence of central nervous system tumors in Gironde, France. *Neuroepidemiology* 2004; **23**: 110-117.
9. Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 1045-1054.
10. Hunt DP. Predicting meningioma recurrence. Royal College of Radiologists Annual Undergraduate Prize in Clinical Oncology, 1999. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1999; **11**: 398-404.
11. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol* 1997; **21**: 1455-1465.
12. Kotecha RS, Junckerstorff RC, Lee S, Cole CH, Gottardo NG. Pediatric meningioma: current approaches and future direction. *J Neurooncol* 2011; **104**: 1-10.
13. Cabada T, Caballero MC, Insausti I, Alvarez de Eulate N, Bacaicoa C, Zazpe I, *et al*. The role of diffusion-weighted imaging in the evaluation of meningiomas: radio-pathologic correlation. *Radiologia* 2009; **51**: 411-419.
14. Bickerstaff ER, Small JM, Guest IA. The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1958; **21**: 89-91.
15. Bozzetti C, Camisa R, Nizzoli R, Manotti L, Guazzi A, Naldi N, *et al*. Estrogen and progesterone receptors in human meningiomas: biochemical and immunocytochemical evaluation. *Surg Neurol* 1995; **43**: 230-233.
16. Roser F, Nakamura M, Bellinzona M, Rosahl SK, Ostertag H, Samii M. The prognostic value of progesterone receptor status in meningiomas. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 1033-1037.
17. Phillips LE, Koepsell TD, van Belle G, Kukull WA, Gehrels JA, Longstreth WT, Jr. History of head trauma and risk of intracranial meningioma: population-based case-control study. *Neurology* 2002; **58**: 1849-1852.
18. Phillips LE, Frankenfeld CL, Drangsholt M, Koepsell TD, van Belle G, Longstreth WT, Jr. Intracranial meningioma and ionizing radiation in medical and occupational settings. *Neurology* 2005; **64**: 350-352.
19. Longstreth WT, Jr., Phillips LE, Drangsholt M, Koepsell TD, Custer BS, Gehrels JA, *et al*. Dental X-rays and the risk of intracranial meningioma: a population-based case-control study. *Cancer* 2004; **100**: 1026-1034.
20. Hanemann CO. Magic but treatable? Tumours due to loss of merlin. *Brain* 2008; **131**: 606-615.
21. Zang KD. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 2001; **93**: 207-220.

22. George B, Ferrario CA, Blanquet A, Kolb F. Cavernous sinus exenteration for invasive cranial base tumors. *Neurosurgery* 2003; **52**: 772-780; discussion 780-772.
23. Calogero JA, Moossy J. Extradural spinal meningiomas. Report of four cases. *J Neurosurg* 1972; **37**: 442-447.
24. Early CB, Sayers MP. Spinal epidural meningioma. Case report. *J Neurosurg* 1966; **25**: 571-573.
25. Gelabert-Gonzalez M, Serramito-Garcia R. Intracranial meningiomas: II. Diagnosis and treatment. *Rev Neurol* 2011; **53**: 226-232.
26. de Divitiis E, Esposito F, Cappabianca P, Cavallo LM, de Divitiis O, Esposito I. Endoscopic transnasal resection of anterior cranial fossa meningiomas. *Neurosurg Focus* 2008; **25**: E8.
27. Pieper DR, Al-Mefty O. Management of intracranial meningiomas secondarily involving the infratemporal fossa: radiographic characteristics, pattern of tumor invasion, and surgical implications. *Neurosurgery* 1999; **45**: 231-238.
28. Shrivastava RK, Sen C, Costantino PD, Della Rocca R. Sphenoorbital meningiomas: surgical limitations and lessons learned in their long-term management. *J Neurosurg* 2005; **103**: 491-497.
29. Shrivastava RK, Segal S, Camins MB, Sen C, Post KD. Harvey Cushing's Meningiomas text and the historical origin of resectability criteria for the anterior one third of the superior sagittal sinus. *J Neurosurg* 2003; **99**: 787-791.
30. Ayerbe J, Lobato RD, de la Cruz J, Alday R, Rivas JJ, Gomez PA, *et al.* Risk factors predicting recurrence in patients operated on for intracranial meningioma. A multivariate analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 1999; **141**: 921-932.
31. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; **20**: 22-39.
32. Sughrue ME, Kane AJ, Shangari G, Rutkowski MJ, McDermott MW, Berger MS, *et al.* The relevance of Simpson Grade I and II resection in modern neurosurgical treatment of World Health Organization Grade I meningiomas. *J Neurosurg* 2010; **113**: 1029-1035.
33. Heald JB, Carroll TA, Mair RJ. Simpson grade: an opportunity to reassess the need for complete resection of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 2014; **156**: 383-388.
34. Schiffer D, SpringerLink e-books (Online service). Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls. In. Dordrecht: Springer; 2006.
35. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97-109.
36. Hayat MA, SpringerLink (Servicio en línea). Tumors of the Central Nervous System, Volume 7 Meningiomas and Schwannomas. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012.
37. Lee JH, Sade B, Choi E, Golubic M, Prayson R. Meningothelioma as the predominant histological subtype of midline skull base and spinal meningioma. *J Neurosurg* 2006; **105**: 60-64.
38. Sandberg AA, Stone JF. The genetics and molecular biology of neural tumors. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
39. Hahn HP, Bundock EA, Hornick JL. Immunohistochemical staining for claudin-1 can help distinguish meningiomas from histologic mimics. *Am J Clin Pathol* 2006; **125**: 203-208.
40. Gelabert-Gonzalez M, Serramito-Garcia R. Intracranial meningiomas: I. Epidemiology, aetiology, pathogenesis and prognostic factors. *Rev Neurol* 2011; **53**: 165-172.
41. Commins DL, Atkinson RD, Burnett ME. Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus* 2007; **23**: E3.
42. Liu Y, Sturgis CD, Bunker M, Saad RS, Tung M, Raab SS, *et al.* Expression of cytokeratin by malignant meningiomas: diagnostic pitfall of cytokeratin to separate malignant meningiomas from metastatic carcinoma. *Mod Pathol* 2004; **17**: 1129-1133.

43. Mehta D, Khatib R, Patel S. Carcinoma of the breast and meningioma. Association and management. *Cancer* 1983; **51**: 1937-1940.
44. Korhonen K, Salminen T, Raitanen J, Auvinen A, Isola J, Haapasalo H. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neurooncol* 2006; **80**: 1-7.
45. Piquer J, Cerda M, Lluch A, Barcia Salorio JL, Garcia-Conde J. Correlations of female steroid hormone receptors with histologic features in meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1991; **110**: 38-43.
46. Taddei GL, Caldarella A, Raspollini MR, Taddei A, Buccoliero AM. [Estrogen and progesterone receptors in meningiomas: immunohistochemical (Mib-1, p53) and clinico-morphological correlations]. *Pathologica* 2002; **94**: 10-15.
47. Hsu DW, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997; **86**: 113-120.
48. Carroll RS, Zhang J, Dashner K, Sar M, Wilson EM, Black PM. Androgen receptor expression in meningiomas. *J Neurosurg* 1995; **82**: 453-460.
49. Fewings PE, Battersby RD, Timperley WR. Long-term follow up of progesterone receptor status in benign meningioma: a prognostic indicator of recurrence? *J Neurosurg* 2000; **92**: 401-405.
50. Wolfsberger S, Doostkam S, Boecher-Schwarz HG, Roessler K, van Trotsenburg M, Hainfellner JA, et al. Progesterone-receptor index in meningiomas: correlation with clinico-pathological parameters and review of the literature. *Neurosurg Rev* 2004; **27**: 238-245.
51. Pravdenkova S, Al-Mefty O, Sawyer J, Husain M. Progesterone and estrogen receptors: opposing prognostic indicators in meningiomas. *J Neurosurg* 2006; **105**: 163-173.
52. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993; **53**: 1312-1316.
53. Vaish V, Sanyal SN. Role of Sulindac and Celecoxib in the regulation of angiogenesis during the early neoplasm of colon: exploring PI3-K/PTEN/Akt pathway to the canonical Wnt/beta-catenin signaling. *Biomed Pharmacother* 2012; **66**: 354-367.
54. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 215-225; discussion 226-219.
55. Urbschat S, Rahnenfuhrer J, Henn W, Feiden W, Wemmert S, Linsler S, et al. Clonal cytogenetic progression within intratumorally heterogeneous meningiomas predicts tumor recurrence. *Int J Oncol* 2011; **39**: 1601-1608.
56. Couce ME, Aker FV, Scheithauer BW. Chordoid meningioma: a clinicopathologic study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2000; **24**: 899-905.
57. Zorludemir S, Scheithauer BW, Hirose T, Van Houten C, Miller G, Meyer FB. Clear cell meningioma. A clinicopathologic study of a potentially aggressive variant of meningioma. *Am J Surg Pathol* 1995; **19**: 493-505.
58. Oviedo A, Pang D, Zovickian J, Smith M. Clear cell meningioma: case report and review of the literature. *Pediatr Dev Pathol* 2005; **8**: 386-390.
59. Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Abell-Aleff PC, Meyer FB. "Rhabdoid" meningioma: an aggressive variant. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1482-1490.
60. Wang XQ, Chen H, Zhao L, Li ST, Hu J, Mei GH, et al. Intracranial papillary meningioma: a clinicopathologic study of 30 cases at a single institution. *Neurosurgery* 2013; **73**: 777-790.
61. Ohta M, Iwaki T, Kitamoto T, Takeshita I, Tateishi J, Fukui M. MIB1 staining index and scoring of histologic features in meningioma. Indicators for the prediction of biologic potential and postoperative management. *Cancer* 1994; **74**: 3176-3189.

62. Abramovich CM, Prayson RA. Histopathologic features and MIB-1 labeling indices in recurrent and nonrecurrent meningiomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; **123**: 793-800.
63. Maier H, Wanschitz J, Sedivy R, Rossler K, Ofner D, Budka H. Proliferation and DNA fragmentation in meningioma subtypes. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; **23**: 496-506.
64. Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, Emmanuele C, Alberio N, Albanese V. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Pathol Res Pract* 2000; **196**: 483-488.
65. Nakasu S, Li DH, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M. Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. *Am J Surg Pathol* 2001; **25**: 472-478.
66. Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *J Neurosurg* 1992; **77**: 616-623.
67. Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Smith JS, McDermott MW. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *J Neurooncol* 2005; **74**: 19-30.
68. Yew A, Trang A, Nagasawa DT, Spasic M, Choy W, Garcia HM, et al. Chromosomal alterations, prognostic factors, and targeted molecular therapies for malignant meningiomas. *J Clin Neurosci* 2013; **20**: 17-22.
69. Barbera S, San Miguel T, Gil-Benso R, Munoz-Hidalgo L, Roldan P, Gonzalez-Darder J, et al. Genetic changes with prognostic value in histologically benign meningiomas. *Clin Neuropathol* 2013; **32**: 311-317.
70. Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A. Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology* 2007; **27**: 114-120.
71. Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. The prognostic significance of MIB-1, p53, and DNA flow cytometry in completely resected primary meningiomas. *Cancer* 1998; **82**: 2262-2269.
72. Yang SY, Park CK, Park SH, Kim DG, Chung YS, Jung HW. Atypical and anaplastic meningiomas: prognostic implications of clinicopathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; **79**: 574-580.
73. Georgiadis P, Kostopoulos S, Cavouras D, Glotsos D, Kalatzis I, Sifaki K, et al. Quantitative combination of volumetric MR imaging and MR spectroscopy data for the discrimination of meningiomas from metastatic brain tumors by means of pattern recognition. *Magn Reson Imaging* 2011; **29**: 525-535.
74. Al-Mefty O, Kadri PA, Pravdenkova S, Sawyer JR, Stangeby C, Husain M. Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. *J Neurosurg* 2004; **101**: 210-218.
75. Krayenbuhl N, Pravdenkova S, Al-Mefty O. De novo versus transformed atypical and anaplastic meningiomas: comparisons of clinical course, cytogenetics, cytokinetics, and outcome. *Neurosurgery* 2007; **61**: 495-503; discussion 503-494.
76. Willis J, Smith C, Ironside JW, Erridge S, Whittle IR, Everington D. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005; **31**: 141-149.
77. Mark J. Chromosomal aberrations and their relation to malignancy in meningiomas: a meningioma with ring chromosomes. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1971; **79**: 193-200.
78. Mark J. Chromosomal abnormalities and their specificity in human neoplasms: an assessment of recent observations by banding techniques. *Adv Cancer Res* 1977; **24**: 165-222.
79. Zang KD, Singer H. Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 1967; **216**: 84-85.
80. Mark J, Levan G, Mitelman F. Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 1972; **71**: 163-168.

81. Zankl H, Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. 4. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as no. 22 by fluorescence technique. *Humangenetik* 1972; **14**: 167-169.
82. Kolles H, Niedermayer I, Schmitt C, Henn W, Feld R, Steudel WI, *et al.* Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien)* 1995; **137**: 174-181.
83. Fabris VT. From chromosomal abnormalities to the identification of target genes in mouse models of breast cancer. *Cancer Genet* 2014; **207**: 233-246.
84. Boensch M, Oberthuer A, Fischer M, Skowron M, Oestreich J, Berthold F, *et al.* Quantitative real-time PCR for quick simultaneous determination of therapy-stratifying markers MYCN amplification, deletion 1p and 11q. *Diagn Mol Pathol* 2005; **14**: 177-182.
85. Rodriguez FJ, Tihan T, Lin D, McDonald W, Nigro J, Feuerstein B, *et al.* Clinicopathologic features of pediatric oligodendrogliomas: a series of 50 patients. *Am J Surg Pathol* 2014; **38**: 1058-1070.
86. Hodge JC, Pearce KE, Clayton AC, Taran FA, Stewart EA. Uterine cellular leiomyomata with chromosome 1p deletions represent a distinct entity. *Am J Obstet Gynecol* 2014; **210**: 572 e571-577.
87. Schneider BF, Shashi V, von Kap-herr C, Golden WL. Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas. A comparative study of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and standard cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **85**: 101-104.
88. Kroeger N, Klatte T, Chamie K, Rao PN, Birkhauser FD, Sonn GA, *et al.* Deletions of chromosomes 3p and 14q molecularly subclassify clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2013; **119**: 1547-1554.
89. Lopez-Guerrero JA, Noguera R, Llombart-Bosch A. GIST: particular aspects related to cell cultures, xenografts, and cytogenetics. *Semin Diagn Pathol* 2006; **23**: 103-110.
90. Weber RG, Bostrom J, Wolter M, Baudis M, Collins VP, Reifenberger G, *et al.* Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 14719-14724.
91. Rempel SA, Schwachheimer K, Davis RL, Cavenee WK, Rosenblum ML. Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* 1993; **53**: 2386-2392.
92. Buschges R, Bostrom J, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, *et al.* Analysis of human meningiomas for aberrations of the MADH2, MADH4, APM-1 and DCC tumor suppressor genes on the long arm of chromosome 18. *Int J Cancer* 2001; **92**: 551-554.
93. Lindblom A, Ruttledge M, Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP. Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 1994; **56**: 354-357.
94. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, *et al.* Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 1997; **14**: 611-616.
95. Simon M, Kokkino AJ, Warnick RE, Tew JM, Jr., von Deimling A, Menon AG. Role of genomic instability in meningioma progression. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; **16**: 265-269.
96. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, *et al.* Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995; **55**: 4696-4701.
97. Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, Westphal M. Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; **110**: 103-110.

98. Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, Perry A. Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 628-636.
99. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, *et al.* NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 1999; **18**: 2231-2239.
100. Bostrom J, Meyer-Puttitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, *et al.* Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16^(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15^(INK4b)), and CDKN2C (p18^(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 2001; **159**: 661-669.
101. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, Scheithauer BW. Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer* 1996; **77**: 2567-2573.
102. Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL, Pestana A, *et al.* Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **9**: 296-298.
103. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A. Loss of 1p in recurrent meningiomas. a comparative study in successive recurrences by cytogenetics and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **125**: 119-124.
104. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, Callaghan R, Collado M, Roldan P, *et al.* Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **148**: 123-128.
105. Murakami M, Hashimoto N, Takahashi Y, Hosokawa Y, Inazawa J, Mineura K. A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **140**: 99-106.
106. Gutmann DH, Donahoe J, Perry A, Lemke N, Gorse K, Kittiniyom K, *et al.* Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1495-1500.
107. Martinez-Glez V, Alvarez L, Franco-Hernandez C, Torres-Martin M, de Campos JM, Isla A, *et al.* Genomic deletions at 1p and 14q are associated with an abnormal cDNA microarray gene expression pattern in meningiomas but not in schwannomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; **196**: 1-6.
108. Bostrom J, Muhlbauer A, Reifenberger G. Deletion mapping of the short arm of chromosome 1 identifies a common region of deletion distal to D1S496 in human meningiomas. *Acta Neuropathol* 1997; **94**: 479-485.
109. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A. Cytogenetical findings of recurrent meningiomas. A study of 10 tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **85**: 113-117.
110. Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak E, Moreno S. Chromosomal involvement secondary to -22 in human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **33**: 275-290.
111. Casalone R, Simi P, Granata P, Minelli E, Giudici A, Butti G, *et al.* Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 65 human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **45**: 237-243.
112. Casartelli C, Rogatto SR, Barbieri Neto J. Karyotypic evolution of human meningioma. Progression through malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; **40**: 33-45.
113. Vagner-Capodano AM, Grisoli F, Gambarelli D, Sedan R, Pellet W, De Victor B. Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 75 human meningiomas. *Neurosurgery* 1993; **32**: 892-900; discussion 900.
114. Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen NA, Stefanko SZ, *et al.* Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 224-235.
115. Pykett MJ, Murphy M, Harnish PR, George DL. Identification of a microsatellite instability phenotype in meningiomas. *Cancer Res* 1994; **54**: 6340-6343.

116. Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; **63**: 275-286.
117. Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A. Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors. *J Neurooncol* 2000; **47**: 99-108.
118. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Collado-Diaz M, Gregori-Romero M, Roldan P, Barbera J, *et al.* Meningioma: a model of cytogenetic evolution in tumoral initiation and progresion. *Neurocirugia (Astur)* 2003; **14**: 517-525.
119. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, Steilen-Gimbel H, Konig J, Zang KD, *et al.* Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 2001; **95**: 601-607.
120. Ketter R, Rahnenfuhrer J, Henn W, Kim YJ, Feiden W, Steudel WI, *et al.* Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 2008; **62**: 61-69; discussion 69-70.
121. Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Bijlsma E, Rouleau G, Laurent-Puig P, *et al.* Screening for germ-line mutations in the NF2 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **12**: 117-127.
122. Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijlsma EK, Lazaro C, *et al.* Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **13**: 211-216.
123. Papi L, De Vitis LR, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, *et al.* Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 1995; **95**: 347-351.
124. Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D, Menon AG, Schramm J, Louis DN, *et al.* Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; **146**: 827-832.
125. Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 1990; **50**: 5863-5867.
126. Seizinger BR, de la Monte S, Atkins L, Gusella JF, Martuza RL. Molecular genetic approach to human meningioma: loss of genes on chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 5419-5423.
127. Cogen PH, Daneshvar L, Bowcock AM, Metzger AK, Cavalli-Sforza LL. Loss of heterozygosity for chromosome 22 DNA sequences in human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **53**: 271-277.
128. Ng HK, Lau KM, Tse JY, Lo KW, Wong JH, Poon WS, *et al.* Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the neurofibromatosis type 2 gene in central nervous system tumors. *Neurosurgery* 1995; **37**: 764-773.
129. Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **6**: 249-274.
130. Al Saadi A, Latimer F, Madercic M, Robbins T. Cytogenetic studies of human brain tumors and their clinical significance. II. Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; **26**: 127-141.
131. Maltby EL, Ironside JW, Battersby RD. Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **31**: 199-210.
132. Prowald A, Wemmert S, Biehl C, Storck S, Martin T, Henn W, *et al.* Interstitial loss and gain of sequences on chromosome 22 in meningiomas with normal karyotype. *Int J Oncol* 2005; **26**: 385-393.
133. Arnoldus EP, Wolters LB, Voormolen JH, van Duinen SG, Raap AK, van der Ploeg M, *et al.* Interphase cytogenetics: a new tool for the study of genetic changes in brain tumors. *J Neurosurg* 1992; **76**: 997-1003.
134. Rey JA, Pestana A, Bello MJ. Cytogenetics and molecular genetics of nervous system tumors. *Oncol Res* 1992; **4**: 321-331.

135. Mark J. Origin of the ring chromosome in a human recurrent meningioma studied with G-band technique. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1973; **81**: 588-590.
136. Sawyer JR, Husain M, Lukacs JL, Stangeby C, Binz RL, Al-Mefty O. Telomeric fusion as a mechanism for the loss of 1p in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **145**: 38-48.
137. Strachan R, Clarke C, Nurbhai M, Marks S. Will chromosome karyotyping of meningiomas aid prediction of tumour recurrence? *Br J Neurosurg* 1989; **3**: 583-589.
138. Berra B, Papi L, Bigozzi U, Serino D, Morichi R, Mennonna P, *et al.* Correlation between cytogenetic data and ganglioside pattern in human meningiomas. *Int J Cancer* 1991; **47**: 329-333.
139. Griffin CA, Hruban RH, Long PP, Miller N, Volz P, Carson B, *et al.* Chromosome abnormalities in meningeal neoplasms: do they correlate with histology? *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **78**: 46-52.
140. Yamada K, Kasama M, Kondo T, Shinoura N, Yoshioka M. Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **73**: 46-52.
141. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 1997; **49**: 267-270.
142. Lee JH, Sundaram V, Stein DJ, Kinney SE, Stacey DW, Golubic M. Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 1997; **40**: 578-587.
143. Ruttledge MH, Xie YG, Han FY, Peyrard M, Collins VP, Nordenskjold M, *et al.* Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **10**: 122-130.
144. Meese E, Blin N, Zang KD. Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 1987; **77**: 349-351.
145. Ruttledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, *et al.* Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 1994; **6**: 180-184.
146. Leuraud P, Marie Y, Robin E, Huguet S, He J, Mokhtari K, *et al.* Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neurooncol* 2000; **50**: 207-213.
147. Ruttledge MH, Rouleau GA. Role of the neurofibromatosis type 2 gene in the development of tumors of the nervous system. *Neurosurg Focus* 2005; **19**: E6.
148. Nunes F, Shen Y, Niida Y, Beauchamp R, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V, *et al.* Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **162**: 135-139.
149. LeKanne Deprez RH, Groen NA, Louz D, Hagemeyer A, van Drunen E, Koper JW, *et al.* Constitutional DNA-level aberrations in chromosome 22 in a patient with multiple meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **9**: 124-128.
150. Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, *et al.* Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent in situ hybridization. *Cancer* 1998; **83**: 360-366.
151. Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Kusak ME, Sarasa JL, Rey JA. High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **120**: 30-36.
152. Sulman EP, Dumanski JP, White PS, Zhao H, Maris JM, Mathiesen T, *et al.* Identification of a consistent region of allelic loss on 1p32 in meningiomas: correlation with increased morbidity. *Cancer Res* 1998; **58**: 3226-3230.
153. Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, Sasaki K. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol* 1999; **41**: 167-174.
154. Leuraud P, Dezamis E, Aguirre-Cruz L, Taillibert S, Lejeune J, Robin E, *et al.* Prognostic value of allelic losses and telomerase activity in meningiomas. *J Neurosurg* 2004; **100**: 303-309.

155. Bello MJ, Leone PE, Nebreda P, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, *et al.* Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **83**: 160-164.
156. Khan J, Parsa NZ, Harada T, Meltzer PS, Carter NP. Detection of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; **103**: 95-100.
157. Arslantas A, Artan S, Oner U, Durmaz R, Muslumanoglu H, Atasoy MA, *et al.* Detection of chromosomal imbalances in spinal meningiomas by comparative genomic hybridization. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2003; **43**: 12-18; discussion 19.
158. Piaskowski S, Rieske P, Szybka M, Wozniak K, Bednarek A, Pluciennik E, *et al.* GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **162**: 63-67.
159. Maruno M, Yoshimine T, Muhammad AK, Ninomiya H, Hayakawa T. Chromosomal losses and gains in meningiomas: comparative genomic hybridization (CGH) study of the whole genome. *Neurol Res* 1998; **20**: 612-616.
160. Muller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel WI, *et al.* Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 3569-3577.
161. Carlson KM, Bruder C, Nordenskjold M, Dumanski JP. 1p and 3p deletions in meningiomas without detectable aberrations of chromosome 22 identified by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **20**: 419-424.
162. Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Reichardt S, Freiler A, Zang KD. Monosomy 7p in meningiomas: a rare constituent of tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **144**: 65-68.
163. Dezamis E, Sanson M. The molecular genetics of meningiomas and genotypic/phenotypic correlations. *Rev Neurol (Paris)* 2003; **159**: 727-738.
164. Simon M, Bostrom JP, Hartmann C. Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery* 2007; **60**: 787-798; discussion 787-798.
165. Maillo A, Orfao A, Espinosa AB, Sayagues JM, Merino M, Sousa P, *et al.* Early recurrences in histologically benign/grade I meningiomas are associated with large tumors and coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone. *Neuro Oncol* 2007; **9**: 438-446.
166. Maillo A, Orfao A, Sayagues JM, Diaz P, Gomez-Moreta JA, Caballero M, *et al.* New classification scheme for the prognostic stratification of meningioma on the basis of chromosome 14 abnormalities, patient age, and tumor histopathology. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 3285-3295.
167. Sayagues JM, Taberner MD, Maillo A, Diaz P, Rasillo A, Bortoluci A, *et al.* Incidence of numerical chromosome aberrations in meningioma tumors as revealed by fluorescence in situ hybridization using 10 chromosome-specific probes. *Cytometry* 2002; **50**: 153-159.
168. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, Kleinschmidt-DeMasters BK, Scheithauer BW. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 2002; **12**: 183-190.
169. Mihaila D, Gutierrez JA, Rosenblum ML, Newsham IF, Bogler O, Rempel SA. Meningiomas: analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in tumor progression and the delineation of four regions of chromosomal deletion in common with other cancers. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 4435-4442.
170. Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, *et al.* Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; **24**: 3-8.
171. Simon M, Park TW, Koster G, Mahlberg R, Hackenbroch M, Bostrom J, *et al.* Alterations of INK4a(p16-p14ARF)/INK4b(p15) expression and telomerase activation in meningioma progression. *J Neurooncol* 2001; **55**: 149-158.
172. Pecina-Slaus N, Nikuseva Martic T, Tomas D, Beros V, Zeljko M, Cupic H. Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene. *J Neurooncol* 2008; **87**: 63-70.

173. Zankl H, Seidel H, Zang KD. Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. V. Preferential loss of sex chromosomes in human meningiomas. *Humangenetik* 1975; **27**: 119-128.
174. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM, *et al.* A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; **75**: 826.
175. Butti G, Assietti R, Casalone R, Paoletti P. Multiple meningiomas: a clinical, surgical, and cytogenetic analysis. *Surg Neurol* 1989; **31**: 255-260.
176. Lomas J, Bello MJ, Alonso ME, Gonzalez-Gomez P, Arjona D, Kusak ME, *et al.* Loss of chromosome 22 and absence of NF2 gene mutation in a case of multiple meningiomas. *Hum Pathol* 2002; **33**: 375-378.
177. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB. Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1423**: M29-36.
178. Ikeda K, Saeki Y, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V, Chiocca EA. Inhibition of NF2-negative and NF2-positive primary human meningioma cell proliferation by overexpression of merlin due to vector-mediated gene transfer. *J Neurosurg* 1999; **91**: 85-92.
179. Hovens CM, Kaye AH. The tumour suppressor protein NF2/merlin: the puzzle continues. *J Clin Neurosci* 2001; **8**: 4-7.
180. Xiao GH, Chernoff J, Testa JR. NF2: the wizardry of merlin. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **38**: 389-399.
181. Xu HM, Gutmann DH. Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 1998; **51**: 403-415.
182. Goutebroze L, Brault E, Muchardt C, Camonis J, Thomas G. Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1699-1712.
183. Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Hamada Y, *et al.* Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1997; **93**: 225-232.
184. Huynh DP, Mautner V, Baser ME, Stavrou D, Pulst SM. Immunohistochemical detection of schwannomin and neurofibromin in vestibular schwannomas, ependymomas and meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 382-390.
185. Evans JJ, Jeun SS, Lee JH, Harwalkar JA, Shoshan Y, Cowell JK, *et al.* Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningotheial meningiomas. *J Neurosurg* 2001; **94**: 111-117.
186. Zwarthoff EC. Neurofibromatosis and associated tumour suppressor genes. *Pathol Res Pract* 1996; **192**: 647-657.
187. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 2003; **17**: 1090-1100.
188. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB. Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Curr Opin Genet Dev* 1996; **6**: 87-92.
189. Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 1999; **59**: 5995-5998.
190. Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD, *et al.* Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest* 1997; **77**: 601-606.
191. Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA, Seizinger BR, Hagemmeijer A, van Drunen E, *et al.* Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 1022-1029.

192. Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, *et al.* Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 1996; **84**: 847-851.
193. Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, *et al.* The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nat Med* 1998; **4**: 915-922.
194. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Martinez-Glez V, Lopez-Marin I, *et al.* Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **42**: 314-319.
195. Lamszus K, Vahldiek F, Mautner VF, Schichor C, Tonn J, Stavrou D, *et al.* Allelic losses in neurofibromatosis 2-associated meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 504-512.
196. Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat C, *et al.* NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J Pathol* 2001; **194**: 367-372.
197. Kimura Y, Saya H, Nakao M. Calpain-dependent proteolysis of NF2 protein: involvement in schwannomas and meningiomas. *Neuropathology* 2000; **20**: 153-160.
198. Kim JH, Kim IS, Kwon SY, Jang BC, Suh SI, Shin DH, *et al.* Mutational analysis of the NF2 gene in sporadic meningiomas by denaturing high-performance liquid chromatography. *Int J Mol Med* 2006; **18**: 27-32.
199. Akagi K, Kurahashi H, Arita N, Hayakawa T, Monden M, Mori T, *et al.* Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *Int J Cancer* 1995; **60**: 178-182.
200. Lekanne Deprez RH, Riegman PH, Groen NA, Warringa UL, van Biezen NA, Molijn AC, *et al.* Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 1995; **10**: 1521-1528.
201. Kedra D, Peyrard M, Fransson I, Collins JE, Dunham I, Roe BA, *et al.* Characterization of a second human clathrin heavy chain polypeptide gene (CLH-22) from chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 625-631.
202. Durmaz R, Arslantas A, Artan S, Ozon YH, Isiksoy S, Basaran N, *et al.* The deletion of 22q13 region in both intracranial and spinal meningiomas in a patient (case report). *Clin Neurol Neurosurg* 1998; **100**: 219-223.
203. Peyrard M, Seroussi E, Sandberg-Nordqvist AC, Xie YG, Han FY, Fransson I, *et al.* The human LARGE gene from 22q12.3-q13.1 is a new, distinct member of the glycosyltransferase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 598-603.
204. Peyrard M, Fransson I, Xie YG, Han FY, Ruttledge MH, Swahn S, *et al.* Characterization of a new member of the human beta-adaptin gene family from chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1393-1399.
205. Peyrard M, Pan HQ, Kedra D, Fransson I, Swahn S, Hartman K, *et al.* Structure of the promoter and genomic organization of the human beta'-adaptin gene (BAM22) from chromosome 22q12. *Genomics* 1996; **36**: 112-117.
206. Zucman-Rossi J, Legoix P, Thomas G. Identification of new members of the Gas2 and Ras families in the 22q12 chromosome region. *Genomics* 1996; **38**: 247-254.
207. Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sevenet N, Delattre O, von Deimling A. INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 2001; **84**: 199-201.
208. Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS, Modrusan Z, Smith JS, Jun P, *et al.* Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 2007; **6**: 64.
209. Gupta R, Rao Gogineni V, Nalla AK, Chetty C, Klopfenstein JD, Tsung AJ, *et al.* Oncogenic role of p53 is suppressed by si-RNA bicistronic construct of uPA, uPAR and cathepsin-B in meningiomas both in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2011; **38**: 973-983.

210. Niedermayer I, Feiden W, Henn W, Steilen-Gimbel H, Steudel WI, Zang KD. Loss of alkaline phosphatase activity in meningiomas: a rapid histochemical technique indicating progression-associated deletion of a putative tumor suppressor gene on the distal part of the short arm of chromosome 1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 879-886.
211. Bouvier C, Liprandi A, Colin C, Giorgi R, Quilichini B, Metellus P, *et al.* Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol* 2005; **124**: 252-258.
212. Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M, Talamantes F, Roldan P. Monosomy 1p and alkaline phosphatase in meningiomas. Citopathological, histochemical and genetical study in 10 tumors. *Med Clin (Barc)* 2002; **118**: 656-658.
213. Leone PE, Mendiola M, Alonso J, Paz-y-Mino C, Pestana A. Implications of a RAD54L polymorphism (2290C/T) in human meningiomas as a risk factor and/or a genetic marker. *BMC Cancer* 2003; **3**: 6.
214. Santarius T, Kirsch M, Nikas DC, Imitola J, Black PM. Molecular analysis of alterations of the p18INK4c gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; **26**: 67-75.
215. Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 605-615.
216. Lomas J, Bello MJ, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, de Campos JM, *et al.* Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **129**: 88-91.
217. Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H, Hamou MF, Diserens AC, Shinohe Y, *et al.* p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade. *Brain Pathol* 2001; **11**: 296-305.
218. Gerber MA, Bahr SM, Gutmann DH. Protein 4.1B/differentially expressed in adenocarcinoma of the lung-1 functions as a growth suppressor in meningioma cells by activating Rac1-dependent c-Jun-NH(2)-kinase signaling. *Cancer Res* 2006; **66**: 5295-5303.
219. Surace EI, Lusic E, Murakami Y, Scheithauer BW, Perry A, Gutmann DH. Loss of tumor suppressor in lung cancer-1 (TSLC1) expression in meningioma correlates with increased malignancy grade and reduced patient survival. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; **63**: 1015-1027.
220. Robb VA, Li W, Gascard P, Perry A, Mohandas N, Gutmann DH. Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis. *Neurobiol Dis* 2003; **13**: 191-202.
221. Lusic EA, Watson MA, Chicoine MR, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, *et al.* Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* 2005; **65**: 7121-7126.
222. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, Simon M, Schramm J, Wiestler OD, *et al.* Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer* 2001; **94**: 218-221.
223. Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K. Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol* 2004; **17**: 705-710.
224. Surace EI, Lusic E, Haipok CA, Gutmann DH. Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression. *Ann Neurol* 2004; **56**: 295-298.
225. Cai DX, James CD, Scheithauer BW, Couch FJ, Perry A. PS6K amplification characterizes a small subset of anaplastic meningiomas. *Am J Clin Pathol* 2001; **115**: 213-218.
226. Wernicke AG, Dicker AP, Whiton M, Ivanidze J, Hyslop T, Hammond EH, *et al.* Assessment of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression in human meningioma. *Radiat Oncol* 2010; **5**: 46.
227. Boldrini L, Pistolesi S, Gisfredi S, Ursino S, Ali G, Pieracci N, *et al.* Expression of endothelin 1 and its angiogenic role in meningiomas. *Virchows Arch* 2006; **449**: 546-553.

228. Lonn S, Rothman N, Shapiro WR, Fine HA, Selker RG, Black PM, *et al.* Genetic variation in insulin-like growth factors and brain tumor risk. *Neuro Oncol* 2008; **10**: 553-559.
229. Sakuma T, Nakagawa T, Ido K, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol* 2008; **88**: 143-155.
230. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, *et al.* A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 97-105.
231. Clark VE, Erson-Omay EZ, Serin A, Yin J, Cotney J, Ozduman K, *et al.* Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science* 2013; **339**: 1077-1080.
232. Schuetz A, Nana D, Rose C, Zoicher G, Milanovic M, Koenigsmann J, *et al.* The structure of the Klf4 DNA-binding domain links to self-renewal and macrophage differentiation. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 3121-3131.
233. Brastianos PK, Horowitz PM, Santagata S, Jones RT, McKenna A, Getz G, *et al.* Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat Genet* 2013; **45**: 285-289.
234. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; **61**: 3225-3229.
235. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; **21**: 163-167.
236. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; **349**: 2042-2054.
237. Liu Y, Pang JC, Dong S, Mao B, Poon WS, Ng HK. Aberrant CpG island hypermethylation profile is associated with atypical and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol* 2005; **36**: 416-425.
238. He S, Pham MH, Pease M, Zada G, Giannotta SL, Wang K, *et al.* A review of epigenetic and gene expression alterations associated with intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus* 2013; **35**: E5.
239. Bello MJ, Aminosos C, Lopez-Marin I, Arjona D, Gonzalez-Gomez P, Alonso ME, *et al.* DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in meningiomas: relationship with the allelic status at 1p and 22q. *Acta Neuropathol* 2004; **108**: 413-421.
240. Barski D, Wolter M, Reifemberger G, Riemenschneider MJ. Hypermethylation and transcriptional downregulation of the TIMP3 gene is associated with allelic loss on 22q12.3 and malignancy in meningiomas. *Brain Pathol* 2010; **20**: 623-631.
241. Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, Oi S, Ito M, Inao S, *et al.* Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *J Neurosurg* 2007; **107**: 398-404.
242. Durand A, Labrousse F, Jouvet A, Bauchet L, Kalamarides M, Menei P, *et al.* WHO grade II and III meningiomas: a study of prognostic factors. *J Neurooncol* 2009; **95**: 367-375.
243. Lomas J, Aminosos C, Gonzalez-Gomez P, Eva Alonso M, Arjona D, Lopez-Marin I, *et al.* Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **148**: 148-151.
244. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet* 2000; **25**: 315-319.
245. Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, Mori M, *et al.* Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003; **22**: 7862-7865.
246. Perez-Magan E, Rodriguez de Lope A, Ribalta T, Ruano Y, Campos-Martin Y, Perez-Bautista G, *et al.* Differential expression profiling analyses identifies downregulation of 1p, 6q, and 14q genes and overexpression of 6p histone cluster 1 genes as markers of recurrence in meningiomas. *Neuro Oncol* 2010; **12**: 1278-1290.

247. Di Vinci A, Brigati C, Casciano I, Banelli B, Borzi L, Forlani A, *et al.* HOXA7, 9, and 10 are methylation targets associated with aggressive behavior in meningiomas. *Transl Res* 2012; **160**: 355-362.
248. Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, *et al.* Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis* 2012; **33**: 436-441.
249. Aydemir F, Yurtcu E, Balci TB, Sahin FI, Gulsen S, Altinors N. Identification of promoter region methylation patterns of MGMT, CDKN2A, GSTP1, and THBS1 genes in intracranial meningioma patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2012; **16**: 335-340.
250. Brokinkel B, Fischer BR, Peetz-Dienhart S, Ebel H, Sepehrnia A, Rama B, *et al.* MGMT promoter methylation status in anaplastic meningiomas. *J Neurooncol* 2010; **100**: 489-490.
251. Guillaudeau A, Durand K, Bessette B, Chaunavel A, Pommepuy I, Progetti F, *et al.* EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS One* 2012; **7**: e37204.
252. Laurendeau I, Ferrer M, Garrido D, D'Haene N, Ciavarelli P, Basso A, *et al.* Gene expression profiling of the hedgehog signaling pathway in human meningiomas. *Mol Med* 2010; **16**: 262-270.
253. Serna E, Morales JM, Mata M, Gonzalez-Darder J, San Miguel T, Gil-Benso R, *et al.* Gene expression profiles of metabolic aggressiveness and tumor recurrence in benign meningioma. *PLoS One* 2013; **8**: e67291.
254. Ildan F, Erman T, Gocer AI, Tuna M, Bagdatoglu H, Cetinalp E, *et al.* Predicting the probability of meningioma recurrence in the preoperative and early postoperative period: a multivariate analysis in the midterm follow-up. *Skull Base* 2007; **17**: 157-171.
255. Kim YJ, Ketter R, Henn W, Zang KD, Steudel WI, Feiden W. Histopathologic indicators of recurrence in meningiomas: correlation with clinical and genetic parameters. *Virchows Arch* 2006; **449**: 529-538.
256. Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F, Neben K, Hahn M, Reifenberger G, *et al.* Microarray-based gene expression profiling of benign, atypical and anaplastic meningiomas identifies novel genes associated with meningioma progression. *Int J Cancer* 2005; **114**: 249-256.
257. Brunner EC, Romeike BF, Jung M, Comtesse N, Meese E. Altered expression of beta-catenin/E-cadherin in meningiomas. *Histopathology* 2006; **49**: 178-187.
258. Martinez-Glez V, Franco-Hernandez C, Alvarez L, De Campos JM, Isla A, Vaquero J, *et al.* Meningiomas and schwannomas: molecular subgroup classification found by expression arrays. *Int J Oncol* 2009; **34**: 493-504.
259. Lomas Huertas J, Bello MJ, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Análisis mutacional y epigenético en meningiomas. In. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones; 2005.
260. Schwartzbaum JA, Ahlbom A, Lonn S, Warholm M, Rannug A, Auvinen A, *et al.* An international case-control study of glutathione transferase and functionally related polymorphisms and risk of primary adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**: 559-565.
261. Linsler S, Kraemer D, Driess C, Oertel J, Kammers K, Rahnenfuhrer J, *et al.* Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence. *PLoS One* 2014; **9**: e94987.
262. Casadio V, Molinari C, Calistri D, Tebaldi M, Gunelli R, Serra L, *et al.* DNA Methylation profiles as predictors of recurrence in non muscle invasive bladder cancer: an MS-MLPA approach. *J Exp Clin Cancer Res* 2013; **32**: 94.
263. Cuevas IC, Slocum AL, Jun P, Costello JF, Bollen AW, Riggins GJ, *et al.* Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 2005; **65**: 5070-5075.
264. Johnson MD, Okediji E, Woodard A. Transforming growth factor-beta effects on meningioma cell proliferation and signal transduction pathways. *J Neurooncol* 2004; **66**: 9-16.

265. Mawrin C, Perry A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol* 2010; **99**: 379-391.
266. Keller A, Ludwig N, Backes C, Romeike BF, Comtesse N, Henn W, *et al.* Genome wide expression profiling identifies specific deregulated pathways in meningioma. *Int J Cancer* 2009; **124**: 346-351.
267. Baia GS, Stifani S, Kimura ET, McDermott MW, Pieper RO, Lal A. Notch activation is associated with tetraploidy and enhanced chromosomal instability in meningiomas. *Neoplasia* 2008; **10**: 604-612.
268. Lu Z, Lam KS, Wang N, Xu X, Cortes M, Andersen B. LMO4 can interact with Smad proteins and modulate transforming growth factor-beta signaling in epithelial cells. *Oncogene* 2006; **25**: 2920-2930.
269. Zellner A, Meixensberger J, Roggendorf W, Janka M, Hoehn H, Roosen K. DNA ploidy and cell-cycle analysis in intracranial meningiomas and hemangiopericytomas: a study with high-resolution DNA flow cytometry. *Int J Cancer* 1998; **79**: 116-120.
270. Cruz-Sanchez FF, Miquel R, Rossi ML, Figols J, Palacin A, Cardesa A. Clinico-pathological correlations in meningiomas: a DNA and immunohistochemical study. *Histol Histopathol* 1993; **8**: 1-8.
271. Taberero MD, Maillo A, Nieto AB, Diez-Tascon C, Lara M, Sousa P, *et al.* Delineation of commonly deleted chromosomal regions in meningiomas by high-density single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; **51**: 606-617.
272. Pfisterer WK, Coons SW, Aboul-Enein F, Hendricks WP, Scheck AC, Preul MC. Implicating chromosomal aberrations with meningioma growth and recurrence: results from FISH and MIB-I analysis of grades I and II meningioma tissue. *J Neurooncol* 2008; **87**: 43-50.
273. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; **123**: 309-314.
274. Monleon D, Morales JM, Gonzalez-Segura A, Gonzalez-Darder JM, Gil-Benso R, Cerda-Nicolas M, *et al.* Metabolic aggressiveness in benign meningiomas with chromosomal instabilities. *Cancer Res* 2010; **70**: 8426-8434.
275. Martinez-Glez V, Franco-Hernandez C, Lomas J, Pena-Granero C, de Campos JM, Isla A, *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; **173**: 170-172.
276. Ewald C, Hofmann T, Kuhn SA, Deufel T, Beetz C, Kalff R. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification in meningiomas. *J Neurooncol* 2008; **90**: 267-273.
277. Feierabend D, Walter J, Grube S, Herbold C, Beetz C, Kalff R, *et al.* Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification and its impact on clinical findings in medulloblastoma. *J Neurooncol* 2014; **116**: 213-220.
278. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; **4**: 844-847.
279. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin* 2004; **20**: 707-712.
280. Hidalgo A, Pina P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 144-146.
281. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1981; **29**: 1349-1353.
282. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature., Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. ISCN 2009 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2009). Basel ; Unionville, CT: Karger; 2009.
283. Dhir R. Tissue microarrays: an overview. *Methods Mol Biol* 2008; **441**: 91-103.

284. Watanabe A, Cornelison R, Hostetter G. Tissue microarrays: applications in genomic research. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; **5**: 171-181.
285. Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. *J Mol Histol* 2007; **38**: 151-157.
286. Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, Del Curto B, Pecciarini L, Uccella S, *et al.* BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2009; **40**: 645-652.
287. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: e57.
288. Eichhorn GL. Metal ions as stabilizers or destabilizers of the deoxyribonucleic acid structure. *Nature* 1962; **194**: 474-475.
289. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000; **404**: 644-651.
290. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013; **15** Suppl 2: 1-56.
291. DiMeco F, Li KW, Casali C, Ciceri E, Giombini S, Filippini G, *et al.* Meningiomas invading the superior sagittal sinus: surgical experience in 108 cases. *Neurosurgery* 2004; **55**: 1263-1272; discussion 1272-1264.
292. Domingues PH, Sousa P, Otero A, Goncalves JM, Ruiz L, de Oliveira C, *et al.* Proposal for a new risk stratification classification for meningioma based on patient age, WHO tumor grade, size, localization, and karyotype. *Neuro Oncol* 2014; **16**: 735-747.
293. Ho CY, Mosier S, Safneck J, Salomao DR, Miller NR, Eberhart CG, *et al.* Genetic profiling by single-nucleotide polymorphism-based array analysis defines three distinct subtypes of orbital meningioma. *Brain Pathol* 2015; **25**: 193-201.
294. Lerner C, Ketter R, Linsler S, Henn W, Oertel J, Urbschat S. Establishment of a molecular cytogenetic analysis for native tumor tissue of meningiomas-suitable for clinical application. *Mol Cytogenet* 2014; **7**: 12.
295. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; **68**: 820-823.
296. van Tilborg AA, Morolli B, Giphart-Gassler M, de Vries A, van Geenen DA, Lurkin I, *et al.* Lack of genetic and epigenetic changes in meningiomas without NF2 loss. *J Pathol* 2006; **208**: 564-573.
297. Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, *et al.* Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999; **59**: 798-802.
298. Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, *et al.* Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2005; **85**: 165-175.
299. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; **15** Spec No: 417-474.
300. Versteeg R, Caron H, Cheng NC, van der Drift P, Slater R, Westerveld A, *et al.* 1p36: every subband a suppressor? *Eur J Cancer* 1995; **31A**: 538-541.
301. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, Lomas J, Arjona D, de Campos JM, *et al.* Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer* 2001; **85**: 204-208.

302. Conde J, Silva SN, Azevedo AP, Teixeira V, Pina JE, Rueff J, *et al.* Association of common variants in mismatch repair genes and breast cancer susceptibility: a multigene study. *BMC Cancer* 2009; **9**: 344.
303. Jiang Z, Hu J, Li X, Jiang Y, Zhou W, Lu D. Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low-density array. *Neurosci Lett* 2006; **409**: 112-117.
304. Furlan D, Sahnane N, Bernasconi B, Frattini M, Tibiletti MG, Molinari F, *et al.* APC alterations are frequently involved in the pathogenesis of acinar cell carcinoma of the pancreas, mainly through gene loss and promoter hypermethylation. *Virchows Arch* 2014; **464**: 553-564.
305. Korshunov A, Cherekaev V, Bekyashev A, Sycheva R. Recurrent cytogenetic aberrations in histologically benign, invasive meningiomas of the sphenoid region. *J Neurooncol* 2007; **81**: 131-137.
306. Holland H, Mocker K, Ahnert P, Kirsten H, Hantmann H, Koschny R, *et al.* High resolution genomic profiling and classical cytogenetics in a group of benign and atypical meningiomas. *Cancer Genet* 2011; **204**: 541-549.
307. Stefansson OA, Moran S, Gomez A, Sayols S, Arribas-Jorba C, Sandoval J, *et al.* A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Mol Oncol* 2015; **9**: 555-568.
308. Villanueva A, Portela A, Sayols S, Battiston C, Hoshida Y, Mendez-Gonzalez J, *et al.* DNA methylation-based prognosis and epidrivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2015.
309. Magnani L, Lupien M. Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2014; **382**: 633-641.
310. Carroll RS, Zhang J, Black PM. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas. *J Neurooncol* 1999; **42**: 109-116.
311. Andreeva AV, Kutuzov MA. Cadherin 13 in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; **49**: 775-790.
312. Kawakami M, Staub J, Cliby W, Hartmann L, Smith DI, Shridhar V. Involvement of H-cadherin (CDH13) on 16q in the region of frequent deletion in ovarian cancer. *Int J Oncol* 1999; **15**: 715-720.
313. Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Asa SL, Yamada S, Mizusawa N, *et al.* Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2007; **20**: 1269-1277.
314. Ogama Y, Ouchida M, Yoshino T, Ito S, Takimoto H, Shiote Y, *et al.* Prevalent hypermethylation of the CDH13 gene promoter in malignant B cell lymphomas. *Int J Oncol* 2004; **25**: 685-691.
315. Rood BR, LePrince D. Deciphering HIC1 control pathways to reveal new avenues in cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2013; **17**: 811-827.
316. Kim JH, Lee SH, Rhee CH, Park SY, Lee JH. Loss of heterozygosity on chromosome 22q and 17p correlates with aggressiveness of meningiomas. *J Neurooncol* 1998; **40**: 101-106.
317. Jenal M, Britschgi C, Fey MF, Tschan MP. Inactivation of the hypermethylated in cancer 1 tumour suppressor--not just a question of promoter hypermethylation? *Swiss Med Wkly* 2010; **140**: 13106.
318. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, Aminoso C, *et al.* Frequent death-associated protein-kinase promoter hypermethylation in brain metastases of solid tumors. *Oncol Rep* 2003; **10**: 1031-1033.
319. Rooprai HK, Liyanage K, King A, Davies D, Martin K, Pilkington GJ. CD44 expression in human meningiomas: An immunocytochemical, immunohistochemical and flow cytometric analysis. *Int J Oncol* 1999; **14**: 855-860.
320. Chen MN, Wang P, Zhang J, Zhou BY, Mao Q, Liu YH. Analysis of the role of hMLH1 hypermethylation and microsatellite instability in meningioma progression. *Genet Mol Res* 2012; **11**: 3933-3941.

321. Nakamura M, Tsunoda S, Sakaki T, Konishi N, Hiasa Y, Tsuzuki T, *et al.* Immunohistochemical study of glutathione S-transferase-pi in meningiomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1995; **35**: 787-790.
322. Mukhopadhyay D, Jung J, Murmu N, Houchen CW, Dieckgraefe BK, Anant S. CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. *Ann N Y Acad Sci* 2003; **1010**: 504-509.
323. Egan KM, Baskin R, Nabors LB, Thompson RC, Olson JJ, Browning JE, *et al.* Brain tumor risk according to germ-line variation in the MLLT10 locus. *Eur J Hum Genet* 2015; **23**: 132-134.
324. Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, *et al.* High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. *BMC Cancer* 2010; **10**: 186.
325. Czarniecka A, Kowal M, Rusinek D, Krajewska J, Jarzab M, Stobiecka E, *et al.* The Risk of Relapse in Papillary Thyroid Cancer (PTC) in the Context of BRAFV600E Mutation Status and Other Prognostic Factors. *PLoS One* 2015; **10**: e0132821.
326. Veneziano L, Barra V, Lentini L, Spatafora S, Di Leonardo A. p14 Prevents Proliferation of Aneuploid Cells by Inducing p53-Dependent Apoptosis. *J Cell Physiol* 2015.
327. Crea F, Danesi R, Farrar WL. Cancer stem cell epigenetics and chemoresistance. *Epigenomics* 2009; **1**: 63-79.