

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDiCiNA

SERViCiO GENERAL DE CiTOMETRíA



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**ALTERACiÓN DEL CROMOSOMA 14 EN MENiNGiOMAS Y
SV RELACiÓN CON LAS CARACTERíSTiCAS CLíNiCO-
BiOLóGiCAS DE LA ENFERMEDAD**

TESiS DOCTORAL

ANA BELÉN ESPiNOSA OQViLLAS

2008



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

D. José Alberto Orfão de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Ana Belén Espinosa Oquillas, titulado “ALTERACIÓN DEL CROMOSOMA 14 EN MENINGIOMAS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 18 de julio del año dos mil ocho.

Fdo. Dr. Alberto Orfão de Matos



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

Dña. María Dolores Tabernero Redondo, Doctora en Medicina y Cirugía

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Ana Belén Espinosa Oquillas, titulado “ALTERACIÓN DEL CROMOSOMA 14 EN MENINGIOMAS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 18 de julio del año dos mil ocho.

Fdo. Dra. María Dolores Tabernero Redondo



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**D. Ángel Maíllo Sánchez, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe de Servicio
de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca**

CERTIFICA QUE:

El trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por Dña. Ana Belén Espinosa Oquillas, titulado “ALTERACIÓN DEL CROMOSOMA 14 EN MENINGIOMAS Y SU RELACIÓN CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS DE LA ENFERMEDAD”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctora en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 18 de julio del año dos mil ocho.

Fdo. Dr. Ángel Maíllo Sánchez

“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños”.

Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

El apartado de agradecimientos de una tesis es quizás una de las partes más complicadas de escribir, puesto que no solamente es una sección que todo el mundo lee, sino que además, es la única que la mayoría de la gente lee. Aparte de esto, siempre cabe la posibilidad de que me olvide de alguien, si esto es así, pido mil disculpas.

En primer lugar, mi agradecimiento va dirigido a mis Directores de Tesis, los doctores Alberto Orfao, María Dolores Tabernero y Ángel Maíllo, por su constante apoyo y colaboración, quienes a pesar de otras muchas ocupaciones y dificultades se comprometieron y trabajaron intensamente para sacar este trabajo adelante. Gracias por haberme brindado la oportunidad de compartir estos años junto a un grupo científico tan puntero y excepcional.

Otro referente muy importante en la consecución de esta Tesis ha sido el Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario de Salamanca, sin el trabajo y el esfuerzo de todo su personal esta Tesis no habría podido realizarse.

Una mención muy muy especial merecen todos mis compañeros de laboratorio, tanto los que todavía siguen formando parte de él como los que durante alguna etapa de su vida lo han hecho: Lourdes, Cristina, María Jara, Arancha, Julia, Quentin, Martín, Manuel, Guillermo, Susana, Ana Rasillo, Juan, Wendy, Carlos, Toño, Juana, Rosa Ana, Dani, Miguel, Sergio, Mari Luz, Paloma, Laura, María, Chema, María Almeida, Andrés, Pilar, Sandra y María de Santiago. Lo mejor de todos estos años ha sido sin duda el haberos conocido, entre todos conseguimos crear un ambiente de trabajo difícil de

superar. Gracias por hacer que venir a trabajar todos los días sea mucho más gratificante y por tantos y tan buenos momentos compartidos! Muchos de vosotros ya habéis terminado esta etapa y a los que aún estáis en ello os doy muchos ánimos porque, aunque no lo parezca, al final todo se consigue.

Quiero agradecer también a Elena, que siempre estuvo ahí, aunque fuera desde “la distancia”, apoyándome y siendo mi mejor amiga. Gracias Helen!!

A Carlos y Eva del CIC porque gracias a su inestimable ayuda y útiles consejos ha podido realizarse la última parte de esta Tesis.

En el plano personal, mi primer agradecimiento es por supuesto para mi familia; para mis padres que, aunque suene a tópico es una verdad como un castillo, son los mejores que se puede tener. Gracias por haber confiado en mí cuando hace ya unos cuantos años decidí venir a Salamanca a “emprender una nueva etapa”, aunque en muchos momentos no comprendieran por qué tardaba tanto tiempo en terminarla... A mi hermana Sandra que, aunque me aconsejara encaminar mi futuro en otras direcciones, me ha dado siempre todo su apoyo en las decisiones más importantes de mi vida.

Una persona muy especial y se puede decir que la principal a la que agradezco y dedico esta Tesis es a Dani, por su constante apoyo y consejos recibidos, porque en los momentos más flojos él me animó más que nadie a seguir y terminar esta etapa, por todos los años compartidos, porque más que mi marido es el mejor amigo que se puede tener en la vida, y por tantas y tantas cosas que me es imposible enumerarlas en estas líneas: GRACIAS!

A mi familia de Salamanca, a Ángel y Mari Sol por considerarme como una hija más y abrirme de par en par las puertas de su casa y de su corazón. A mis cuñados y cuñadas, muchos de ellos han vivido en primera persona lo que significa e implica la realización de una Tesis: Javier (alias Bambino, un niño grande), Pablo y Cori (porque los fríos viernes de invierno nos calentábamos con los vinitos y luego claro... jeje!!), Cristina y Cristian (vosotros más que nadie habéis “sufrido” esta etapa), Anita Dinamita (al final, el 2008 va a ser nuestro año!) y Belén y Álvaro (cuñi...).

Un agradecimiento muy especial lo merece sin duda la ciudad de Salamanca, que me acogió y enamoró desde el primer día cuando hace 14 años decidí venir a estudiar a esta maravillosa ciudad, y donde he pasado, de momento, los mejores años de mi vida.

Por último, me es imprescindible agradecer a todos los pacientes de este y de todos los trabajos porque gracias a su generosidad se puede ir avanzando poco a poco en el conocimiento de esta terrible epidemia que nos azota constantemente: el cáncer.

A mis padres

A mi hermana

A Dani

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALPL: fosfatasa alcalina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BAC: cromosoma artificial de bacterias

CGH: hibridación genómica comparada

EMA: antígeno epitelial de membrana

FISH: hibridación *in situ* fluorescente

GPS: puntuación de progresión genética

iFISH: hibridación *in situ* fluorescente sobre células en interfase

LOH: pérdida de heterocigosidad

NF2: neurofibromatosis tipo 2

NHEJ: unión de extremos no homólogos

OMS: organización mundial de la salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RMN: resonancia magnética nuclear

SNC: sistema nervioso central

SNP: polimorfismo de nucleótido único

TAC: tomografía axial computerizada

VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- GENERALIDADES.	3
2.- LA RECIDIVA EN LOS MENINGIOMAS.	5
2.1.- <i>CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL TUMOR PRIMARIO Y DE LA RECIDIVA.</i>	6
3.- ALTERACIONES GENÉTICAS DE LOS MENINGIOMAS.	10
3.1.- <i>ALTERACIONES GENÉTICAS RELACIONADAS CON EL ORIGEN DE LA CÉLULA NEOPLÁSICA.</i>	11
3.2.- <i>ALTERACIONES GENÉTICAS SECUNDARIAS Y PROGRESIÓN TUMORAL.</i>	14
3.2.1.- Modelos hipotéticos de evolución clonal.	15
3.2.2.- Anomalías citogenéticas y moleculares del cromosoma 1 asociadas a progresión tumoral.	20
3.2.3.- Otras alteraciones genéticas/cromosómicas implicadas en la progresión tumoral.	22
3.3.- <i>IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS.</i>	25
3.4.- <i>ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CROMOSOMA 14.</i>	29
3.4.1.- Mecanismos implicados en la pérdida de material genético del cromosoma 14 en meningiomas.	31
3.4.1.1.- <i>Alteraciones de la segregación cromosómica durante la mitosis.</i>	34
3.4.1.2.- <i>Alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN.</i>	38

3.3.4.1.3.- <i>Alteraciones a nivel de los telómeros.</i>	41
3.4.2.- <i>Ontogenia de pérdidas del cromosoma 14 en meningiomas.</i>	44
3.4.3.- <i>Impacto pronóstico de las alteraciones del cromosoma 14 en los meningiomas.</i>	46
4.- FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS MENINGIOMAS.	51
4.1. <i>IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL TUMOR PRIMITIVO.</i>	53
4.2.- <i>IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS NEURORADIOLÓGICAS DEL TUMOR PRIMITIVO.</i>	55
4.3.- <i>IMPACTO PRONÓSTICO DEL TRATAMIENTO QUIRÚGICO</i>	57
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.	61
III. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.	67
3.1.- <i>ARTÍCULO 1: La relación citogenética entre meningiomas primarios y recurrentes sugiere la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con alto riesgo de recidiva</i>	71
3.2.- <i>ARTÍCULO 2: Las recidivas precoces de meningiomas histológicamente benignos o de grado I se asocian con tumores de gran tamaño en los que coexisten la presencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral.</i>	85

3.3.- ARTÍCULO 3: El género de los pacientes con meningioma se asocia con diferentes patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica vinculada a los cromosomas sexuales.	97
3.4.- ARTÍCULO 4: Caracterización de las alteraciones del cromosoma 14 en 124 meningiomas empleando técnicas de hibridación in situ fluorescente e hibridación genómica comparada.	111
3.5.- ARTÍCULO 5: Identificación de alteraciones en el número de copias de pequeñas regiones del cromosoma 14 en meningiomas mediante técnica de “arrays” de hibridación genómica comparada (“arrays” de CGH) con sondas de alta resolución (clones BAC).	121
IV. DISCUSIÓN.	133
4.1.- Relación entre el perfil genético de los meningiomas primarios y sus recidivas: implicaciones en el comportamiento clínico-biológico y evolutivo del tumor.	137
4.2.- Patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica en meningiomas de varones y de mujeres: implicación en el predominio femenino de estos tumores.	143
4.3.- Alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas y su impacto en las características clínico-biológicas y evolutivas de la enfermedad.	147
V. CONCLUSIONES	153

I. INTRODUCCIÓN

1.- GENERALIDADES.

Los meningiomas son tumores primarios del sistema nervioso central (SNC), extraaxiales, habitualmente no infiltrantes, de crecimiento lento y comportamiento benigno; proceden de la transformación neoplásica de células aracnoideas de las meninges que recubren el cerebro y la médula espinal, adhiriéndose a la duramadre^{1,2}. En términos generales, los meningiomas representan alrededor de entre 13% y 26% de todos los tumores primarios del SNC y 25% de los tumores espinales³. Su incidencia en la población adulta se cifra en torno a 6 nuevos casos por 100.000 habitantes y año, y la edad media de aparición se sitúa en torno a los 60 años, con una frecuencia máxima entre la quinta y la séptima décadas de la vida⁴; son excepcionales por debajo de los 20 años y en edades pediátricas (1,5% de todos los meningiomas)⁴. En relación a la distribución por sexos, en los meningiomas se observa un claro predominio de mujeres sobre los varones, especialmente en los tumores espinales y en los subtipos histológicamente benignos³⁻⁶. Aunque se ha planteado que la expresión de receptores de progesterona podría estar relacionada con su mayor incidencia en mujeres^{7,8}, hasta la fecha esta hipótesis no ha podido confirmarse de forma definitiva.

Las formas de presentación clínica y el tratamiento de los pacientes con meningiomas apenas han cambiado en los últimos años; no obstante, la introducción de nuevas técnicas de diagnóstico por imagen, como la tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN)^{9,10}, junto al desarrollo de nuevas estrategias y aproximaciones quirúrgicas, han contribuido a facilitar un diagnóstico temprano y más preciso de este tipo de tumores, con una mayor frecuencia de casos asintomáticos y de tumores de pequeño tamaño⁹. Además, los avances en las técnicas diagnósticas pre-operatorias como la RMN, permiten no sólo la identificación de la

presencia de una masa tumoral, sino también establecer con precisión los límites del tumor; todo esto, combinado con la capacidad de evaluación multiplanar de estas técnicas, permite visualizar y definir con exactitud la existencia o no de afectación dural, la posible invasión de estructuras vecinas y el grado de extensión del tumor¹⁰. Ante la sospecha clínica y radiológica de tumor, el diagnóstico definitivo de los meningiomas se establece tras la cirugía, mediante criterios histopatológicos¹¹.

A pesar de que generalmente se considera que los meningiomas son neoplasias benignas, a los 10 años de la cirugía alrededor de 20-25% de los casos han recidivado, lo que en gran medida acaba por condicionar el comportamiento clínico de la enfermedad y la supervivencia global de los pacientes^{6,12,13}. A diferencia de lo que ocurre en otros tumores humanos, las metástasis son excepcionales en los meningiomas, detectándose en menos del 1% de los casos¹⁴⁻¹⁷. En estos casos, los órganos diana de las metástasis son habitualmente el pulmón (60% de los meningiomas metastásicos) seguido del hígado, bazo, ganglios linfáticos y hueso¹⁷⁻²⁴. Asimismo, aunque habitualmente los meningiomas son tumores esporádicos, en alrededor de 8% de los casos se observan meningiomas múltiples¹²; este porcentaje se incrementa de forma significativa en pacientes con neurofibromatosis tipo 2 (NF2)^{25,26}, un síndrome tumoral de naturaleza autosómica dominante donde la presencia de meningiomas se asocia a mutaciones del gen NF2²⁶. En estos últimos casos, se ha sugerido que los meningiomas que coexisten en un mismo paciente podrían tener un origen independiente, mientras que en pacientes que no padecen NF2, los estudios genético-moleculares han corroborado el origen monoclonal y directamente relacionado entre los distintos tumores, tanto en aquellos casos que muestran meningiomas múltiples al diagnóstico como en los tumores recurrentes^{27,28}. Como posible explicación a estos hechos se ha sugerido que podría existir una propagación intradural o subaracnoidal,

asociada o no a una predisposición genética/ambiental a desarrollar este tipo de tumores^{29,30}.

2.- LA RECIDIVA EN LOS MENINGIOMAS.

La eventualidad de una recidiva en pacientes con meningioma es un hecho bien conocido, ya relatado por Cushing a principios del siglo XX³¹, constituyendo ésta la principal complicación clínica de este tipo de tumores^{14-16,32-34}.

Al diagnóstico, los meningiomas habitualmente se presentan como tumoraciones histológicamente benignas, encapsuladas y delimitadas del parénquima cerebral circundante; tienen un crecimiento lento y su extirpación completa implica la curación del paciente en un alto porcentaje de casos¹². Sin embargo, algunos meningiomas son clínicamente agresivos, observándose recidivas, con idéntica o diferente localización respecto a la observada al diagnóstico, en aproximadamente una cuarta parte de los casos³⁴⁻³⁷. La recidiva ocurre incluso en casos donde microscópicamente se ha realizado una resección completa del tumor^{13,15,36}. Clínicamente, la recurrencia representa el factor pronóstico más relevante a la hora de determinar la supervivencia global de estos pacientes^{14-16,34}, ya que la realización de una nueva intervención casi siempre conlleva un mayor riesgo y dificultad que la cirugía inicial y está asociada a mayor morbilidad³⁸.

El uso de técnicas de imagen como la TAC y la RMN, en el seguimiento postoperatorio de pacientes con meningiomas, ha disminuido el tiempo necesario para detectar la recidiva del tumor³⁹. No obstante, al considerar la recurrencia de los meningiomas, debemos diferenciar la verdadera recidiva tumoral del crecimiento

progresivo de un tumor que no ha sido extirpado de forma completa⁴⁰, aunque esta distinción puede resultar difícil en algunos casos.

2.1.- CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL TUMOR PRIMARIO Y DE LA RECIDIVA.

En el año 1979, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la primera clasificación histológica de los meningiomas⁴¹, clasificación que desde entonces, ha sido revisada periódicamente^{11,12,42}. En esta clasificación, los meningiomas se agrupan de acuerdo con aquellas características histopatológicas que muestran una mayor asociación con la agresividad del tumor como la atipia nuclear, la presencia de figuras mitóticas, el incremento de la celularidad, la pérdida de la arquitectura celular y la presencia de necrosis o invasión cerebral. De esta manera, se definen tres grupos de meningiomas de acuerdo al grado de malignidad: meningiomas de grado I o benignos, tumores de grado II o atípicos y meningiomas de grado III o anaplásicos¹¹.

La gran mayoría de los meningiomas son histopatológicamente benignos (grado I), representando este subgrupo de meningiomas aproximadamente 90% de los casos de nuevo diagnóstico¹¹. Entre los tumores histológicamente benignos, se incluye un pequeño porcentaje de casos ($\approx 10\%$) en los que puede existir invasión de la duramadre, el cerebro e incluso de otros compartimentos extracraneales, como las órbitas y la piel^{43,44}, lo que dificulta la exéresis completa del tumor. A su vez, los meningiomas histopatológicamente agresivos se clasifican como atípicos (o de grado II) y anaplásicos (o de grado III), y comprenden entre 5-7% y 1-3% de todos los meningiomas, según los criterios de la última versión de la clasificación de la OMS de los tumores del SNC¹¹, respectivamente.

En la tabla 1 se reflejan las características diferenciales de los distintos subtipos histológicos de meningiomas, según la revisión más reciente de la clasificación de la OMS¹¹.

Tabla 1. Clasificación histopatológica de los meningiomas según la OMS (2007)¹¹

GRADO TUMORAL	SUBTIPOS HISTOLÓGICOS	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS
I/ benigno	Meningoteliomatoso Fibroblástico Transicional Psamomatoso Angiomatoso Microquístico Secretor Linfoplasmocítico Metaplásico	No presentan criterios de grado II o III.
II/ atípico	Atípico Cordoide De células claras	≥4 mitosis/ 10 campos microscópicos a gran aumento (≥2.5/mm ²) ó al menos 3 de las características siguientes: hiper celularidad, células pequeñas, necrosis, nucleolos prominentes, células “laminadas”, y/o invasión cerebral sin características de tumor de grado III.
III/ anaplásico	Anaplásico Papilar Rabdoide	≥20 mitosis/ 10 campos microscópicos a gran aumento (≥12.5/mm ²) y/o características citológicas malignas (p.ej.: presencia de células tumorales semejantes a carcinoma, sarcoma o melanoma).

Dentro de los meningiomas de grado I o benignos, los subtipos histológicos más frecuentes corresponden a las variantes meningotelial, fibroblástica y transicional¹¹. Los tumores meningoteliomatosos se caracterizan por presentar células en remolinos, dispuestas concéntricamente como masas lobuladas de células meningoteliales en las que la membrana celular no está bien definida, adquiriendo aspecto de sincitio. Los meningiomas de subtipo fibroso o fibroblástico están compuestos por fascículos de

células similares a los fibroblastos y típicamente contienen colágeno y reticulina, que pueden asociarse focalmente a formaciones espirales y cuerpos de psamoma. Finalmente, los meningiomas transicionales están constituidos por tumores con características mixtas entre los dos subtipos anteriores⁴⁵.

Aunque en la actualidad carecemos de marcadores inmunohistoquímicos específicos de las células tumorales de los meningiomas, éstas habitualmente muestran expresión variable del antígeno epitelial de membrana (EMA)⁴⁶ junto a fuerte reactividad para vimentina⁴⁷; asimismo, suelen mostrar un bajo índice proliferativo y positividad para receptores de progesterona^{48,49}, marcadores cuya expresión se ha asociado con el grado histopatológico del tumor⁵⁰⁻⁵³.

Desde el punto de vista pronóstico, en los meningiomas benignos la incidencia de recidiva a los 5 años se sitúa en torno al 5% de los casos, mientras que en el mismo periodo, ésta alcanza el 40% y 80% en los tumores atípicos y anaplásicos^{34,54-56}, respectivamente.

Histológicamente, la mayoría de los meningiomas recurrentes muestran características idénticas o similares a las observadas al diagnóstico⁵⁷. Por este motivo se cree que la recidiva, aunque puede ocurrir muchos años después de la cirugía inicial, podría deberse, más que al desarrollo de un nuevo meningioma, al recrecimiento de células tumorales residuales, o a ambos. En contraposición, en una pequeña proporción de los meningiomas recidivantes se observa progresión hacia otros grados histológicos^{32,33,54,58}; aunque se trata de un hallazgo relativamente infrecuente, cuando esto sucede, el cambio es casi siempre hacia un grado más avanzado, incluso cuando se observan múltiples recidivas, sin que apenas se observe disminución en el grado histológico del tumor⁵⁴. Pese al peor pronóstico de los tumores atípicos y anaplásicos respecto a los meningiomas de grado I, dentro de los meningiomas histológicamente

malignos, los casos diagnosticados *de novo* muestran mayor supervivencia que los que progresan desde meningiomas de grados histopatológicos inferiores (p.ej. de grado I)⁵⁹. Aunque la recidiva podría resultar de una mayor dificultad técnica para lograr una resección total del tumor, con frecuencia en los tumores donde se observa progresión histológica, se constata una rápida recidiva, a pesar de estar totalmente resecado el tumor original y haberse sometido incluso el paciente a tratamiento radioterápico⁵⁹. No obstante, al menos en algunos casos, ante la constatación de una transformación maligna desde tumores benignos o atípicos, debe realizarse una reevaluación de la histología del tumor inicial para descartar un diagnóstico incorrecto. Por este y por otros motivos, la tasa global de progresión desde un tumor de grado I o II, a un meningioma maligno oscila ampliamente en la literatura (entre 2% y 57%^{32,33,54,58-60} y entre 5% y 33%^{60,61} de los casos, respectivamente). A su vez, en la actualidad sigue sin dilucidarse si todos los meningiomas con progresión hacia tumores anaplásicos pasan previamente por un estadio de tumor atípico; si realmente esto ocurriera, el tumor permanecería en grado de atipia por un corto periodo de tiempo. De acuerdo con esta hipótesis, se ha referido que el espacio de tiempo que transcurre entre la aparición de un meningioma y su transformación maligna, es considerablemente menor para los casos que progresan hacia variantes anaplásicas, respecto a los que progresan desde un tumor benigno a atípico⁵⁸. Además, se desconoce si los tumores que se diagnostican *de novo* como atípicos, también derivan de la evolución desde un estadio inicial benigno, clínicamente silente.

3.- ALTERACIONES GENÉTICAS DE LOS MENINGIOMAS.

Actualmente se reconoce que la ontogenia tumoral, que conlleva la infiltración y conversión de un tejido normal en tejido neoplásico, es la consecuencia de una serie de desequilibrios moleculares que conducen a la pérdida del control normal sobre la proliferación, diferenciación y/o supervivencia celular, así como de las interacciones de dichas células alteradas con el micromedioambiente que las rodea⁶². En este proceso, las alteraciones genéticas desempeñan un papel ontogénico clave^{63,64}, acumulándose de forma progresiva en las células neoplásicas del tumor⁶⁵. Esto es debido a la existencia de inestabilidad genética y/o cromosómica, que habitualmente se manifiestan en la ocurrencia y coexistencia de combinaciones de múltiples alteraciones cromosómicas, genéticas y/o moleculares a nivel de las células tumorales de cada paciente⁶⁴.

En las dos últimas décadas se ha incrementado de forma notable el número de estudios en los que se analizan las características citogenéticas de los meningiomas⁶⁶⁻⁷³. En la mayoría de los casos, la caracterización citogenética de estos tumores se ha realizado mediante técnicas cariotípicas convencionales^{68,73,74} complementadas a partir de la década de los 90, con métodos moleculares dirigidos a la identificación de alteraciones concretas. Con este último objetivo, se han empleado técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) sobre núcleos interfásicos (iFISH)⁷⁰, hibridación genómica comparada (CGH)⁷⁵ y PCR, enfocadas a la identificación de pérdida de heterocigosidad (LOH)⁷⁶ a nivel de genes concretos o de secuencias más amplias del genoma. Más recientemente, a esta batería de aproximaciones metodológicas al estudio genético y molecular de los meningiomas, se han añadido técnicas de “arrays”, incluyendo entre otras, las técnicas de “microarrays” de expresión⁷⁷⁻⁷⁹ y de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) o CGH^{80,81}; con estas aproximaciones se

logra un análisis masivo y de alta resolución de las alteraciones genéticas presentes en las células tumorales de los meningiomas^{77-80,82}.

En conjunto, los estudios anteriores han puesto de manifiesto que las alteraciones cromosómicas más frecuentes en los meningiomas consisten en pérdidas y/o deleciones localizadas en uno o varios cromosomas⁸³. Las deleciones normalmente se originan por mecanismos que conllevan rotura de la cadena de ADN y errores en los sistemas de reparación de la misma⁸⁴, sin que se conozcan por el momento sus verdaderas causas. No obstante, según su impacto en el comportamiento del tumor, se ha propuesto la existencia de: i) alteraciones cromosómicas primarias, que actuarían en el proceso de transformación neoplásica como un mecanismo generador de inestabilidad, promoviendo la variabilidad genética a partir de la cual aparecerían ii) otras alteraciones secundarias, que a su vez influirían de forma definitiva en el comportamiento clínico y evolutivo del tumor.

3.1.- ALTERACIONES GENÉTICAS RELACIONADAS CON EL ORIGEN DE LA CÉLULA NEOPLÁSICA.

Los meningiomas constituyen uno de los primeros subtipos de tumores sólidos en los que se constató la existencia de alteraciones cromosómicas recurrentes⁸⁵. En este sentido, la alteración más frecuentemente encontrada en meningiomas esporádicos consiste en anomalías genéticas o epigenéticas que afectan al gen supresor NF2, localizado en la región cromosómica 22q12.2, y cuya frecuencia oscila entre 20% y 60% de los casos⁸⁶⁻⁸⁹. De acuerdo con ello, los estudios citogenéticos señalan que la alteración cromosómica más frecuente en los meningiomas es la pérdida total o parcial del cromosoma 22 y que ésta podría constituir el primero, o uno de los primeros

cambios que ocurren en el desarrollo de estos tumores^{90,91}. Esta observación cariotípica se ha corroborado empleando marcadores polimórficos que han puesto de manifiesto la existencia de LOH a nivel del cromosoma 22q en alrededor del 40 a 70% de todos los meningiomas⁹²⁻⁹⁴, si bien en algunos de estos casos, la célula tumoral sigue conservando dos copias del cromosoma 22^{67,95-98}. La posible explicación a este último hallazgo reside por una parte, en la posibilidad de que tras la pérdida de un cromosoma 22, el otro cromosoma 22 se duplique, proporcionando un patrón homocigótico asociado a una dotación numérica diploide⁹⁶; alternativamente, en otros casos podría tener lugar una microdelección o mutación en uno o varios locus de un cromosoma 22, con lo que esto no tendría expresión a nivel citogenético, al seguir detectándose las dos copias del cromosoma 22⁹⁹. Desde el punto de vista patogénico, la mayor parte de las mutaciones que afectan al gen NF2 en meningiomas conllevan la inactivación de la proteína merlina¹⁰⁰. Esta proteína pertenece a la familia 4.1 de proteínas estructurales, localizándose en la membrana plasmática donde participa en la unión de ésta con el citoesqueleto¹⁰¹. Aunque sigue sin dilucidarse el mecanismo exacto por el que la proteína merlina ejerce su actividad reguladora sobre el crecimiento tumoral, se ha demostrado que la carencia de esta proteína conduce a una pérdida de la polaridad celular, un aumento de la motilidad y de la capacidad de migración e invasión tisular, a la vez que reduce la inhibición de la proliferación celular mediada por contacto¹⁰².

Diversos estudios han demostrado que, además de las anomalías del cromosoma 22, en los meningiomas con frecuencia se observa la presencia de alteraciones numéricas y/o estructurales que afectan a otros cromosomas, y que pueden asociarse o no a monosomía 22/22q^{35,103-115}. Estas alteraciones incluyen principalmente pérdidas del cromosoma 1p^{35,103-107} junto con delección o monosomía de los cromosomas 14^{35,108-110} y 18^{111,112} y de los cromosomas sexuales¹¹³⁻¹¹⁵. Estos hallazgos indican que, como

ocurre en otro tipo de neoplasias, los meningiomas representan un grupo de tumores citogenéticamente heterogéneos, existiendo una gran variabilidad en relación con la incidencia exacta de cada anomalía genética concreta. Así, dependiendo de las series analizadas, la frecuencia de monosomía 22/22q⁻ y de monosomía 14/14q⁻ oscila entre 31% y 78%^{70,92,116,117} y entre 10% y 65% de los casos^{73,115,118-120}, respectivamente. Esta importante variabilidad podría deberse entre otros motivos, a cuestiones metodológicas como el tipo de técnica citogenética/molecular utilizada, los criterios empleados para definir la presencia de anomalías en estos cromosomas, el número de pacientes analizados en cada serie y/o la frecuencia de células portadoras de cada alteración en cada tumor concreto.

Precisamente en relación con este último aspecto, a la hora de estudiar la heterogeneidad genética a nivel intratumoral, resulta imprescindible disponer de técnicas que, mediante la identificación simultánea de dos o más alteraciones cromosómicas en una misma célula, permitan la caracterización genética de todas y cada una de las poblaciones de células neoplásicas presentes en el tumor, en ausencia de selección clonal. Mediante este tipo de estrategias, recientemente hemos comprobado la existencia de dos o más clones citogenéticamente diferentes en la mayoría (55%) de los meningiomas¹⁰⁷; además, hemos podido establecer de forma sistemática, la secuencia hipotética de aparición de las alteraciones genéticas características de cada uno de los clones de células neoplásicas que coexistían en el mismo tumor¹⁰⁷. Esta aproximación al estudio de la heterogeneidad genética a nivel intratumoral, facilita también la identificación y distinción entre alteraciones genéticas primarias y secundarias. De acuerdo con este concepto de evolución clonal⁶⁴, la monosomía 22/22q⁻, la pérdida de un cromosoma sexual (Y en varones y X en mujeres), la deleción del cromosoma 1p o la monosomía 14/14q⁻ de forma aislada o en combinación con la pérdida simultánea

de otros cromosomas, representarían las anomalías citogenéticas más tempranas en el proceso de transformación neoplásica de los meningiomas¹⁰⁷. Aunque se han descrito casos donde una alteración citogenética (p.ej. monosomía 14) se detecta en regiones concretas del tumor, sugiriendo la existencia de una expansión clonal focal, con frecuencia se observa un patrón mixto en el que coexisten células tumorales con diferentes patrones de alteración genética a lo largo de todo el tejido tumoral; estos hallazgos apoyarían la existencia de patrones complejos de distribución tisular de los diferentes clones que coexisten en un mismo tumor¹¹⁰.

Pese a estos avances en el conocimiento de la heterogeneidad genética de los meningiomas y de las alteraciones primarias presentes en los mismos, en la actualidad seguimos sin disponer de evidencias definitivas sobre cuales son las vías o cascadas de señalización responsables de los primeros eventos asociados a la transformación neoplásica de los meningiomas.

3.2.- ALTERACIONES GENÉTICAS SECUNDARIAS Y PROGRESIÓN TUMORAL.

El concepto de progresión tumoral fue descrito en 1954 por Foulds¹²¹ como la adquisición secuencial de múltiples cambios genéticos y fenotípicos que confieren a las células afectadas características progresivamente más agresivas/malignas. Para que la progresión tumoral sea posible, se requiere un cierto grado de inestabilidad genética que facilite la aparición de cambios genéticos de forma continuada, asociado a la generación de múltiples subclones en los que se acumulan un número creciente de anomalías que, en su conjunto, van permitiendo a la célula tumoral afrontar las presiones de selección derivadas de su dependencia de las señales del micromedioambiente tumoral⁶².

3.2.1.- Modelos hipotéticos de evolución clonal.

En las últimas décadas se han propuesto diferentes vías de evolución clonal, en las que se definen en base a observaciones experimentales, las secuencias hipotéticas de adquisición y acumulación de alteraciones genéticas, cromosómicas y moleculares que ocurrirían en la ontogenia y progresión de los meningiomas, desde los tumores histológicamente benignos hasta las formas que presentan un mayor grado de atipia y agresividad histológica (meningiomas atípicos y anaplásicos)^{110,122,123}. Sin embargo, la mayoría de estos modelos hipotéticos de evolución y progresión tumoral, se han fundamentado en la extrapolación de resultados de estudios citogenéticos obtenidos a través de la comparación de diferentes tumores, sin que se hubieran contrastado a nivel intratumoral las hipotéticas vías de evolución citogenética propuestas^{35,122,124}. Así, hoy se sabe que el comportamiento histopatológico agresivo de los meningiomas se asocia con cariotipos complejos en los que se combinan, junto a las alteraciones citogenéticas más características de meningiomas benignos, pérdidas adicionales de material genético de uno o más cromosomas, ganancias cromosómicas y diferentes reordenamientos estructurales^{73,83,91,124-126}. De acuerdo con ello, las pérdidas de material genético a nivel de los cromosomas 1p, 6q, 10q, 14q y 18q y las ganancias de 1q, 9q, 12q, 15q, 17q y 20q son anomalías relativamente comunes en los meningiomas atípicos^{35,119,122}. Los tumores anaplásicos comparten estas alteraciones y muestran además, con mayor frecuencia, pérdidas en 6q, 10q y 14q, junto a deleciones adicionales de 9p y ganancias o amplificaciones a nivel de 17q23^{35,119,122,127}. En la figura 1 se representa de forma esquemática un modelo de progresión tumoral basado en datos de la literatura^{35,53,91,108,110,112,120,122,124,128-134}, con la secuencia de alteraciones genéticas que se acumularían en la célula neoplásica desde los meningiomas benignos a los tumores

atípicos y anaplásicos. No obstante, como hemos comentado anteriormente, hoy se conoce que pese a esta asociación, sólo una pequeña parte de los casos que recidivan muestran progresión histológica, siendo la progresión hacia grados histológicos más avanzados del tumor, un hallazgo relativamente infrecuente^{32,33,54,135}.

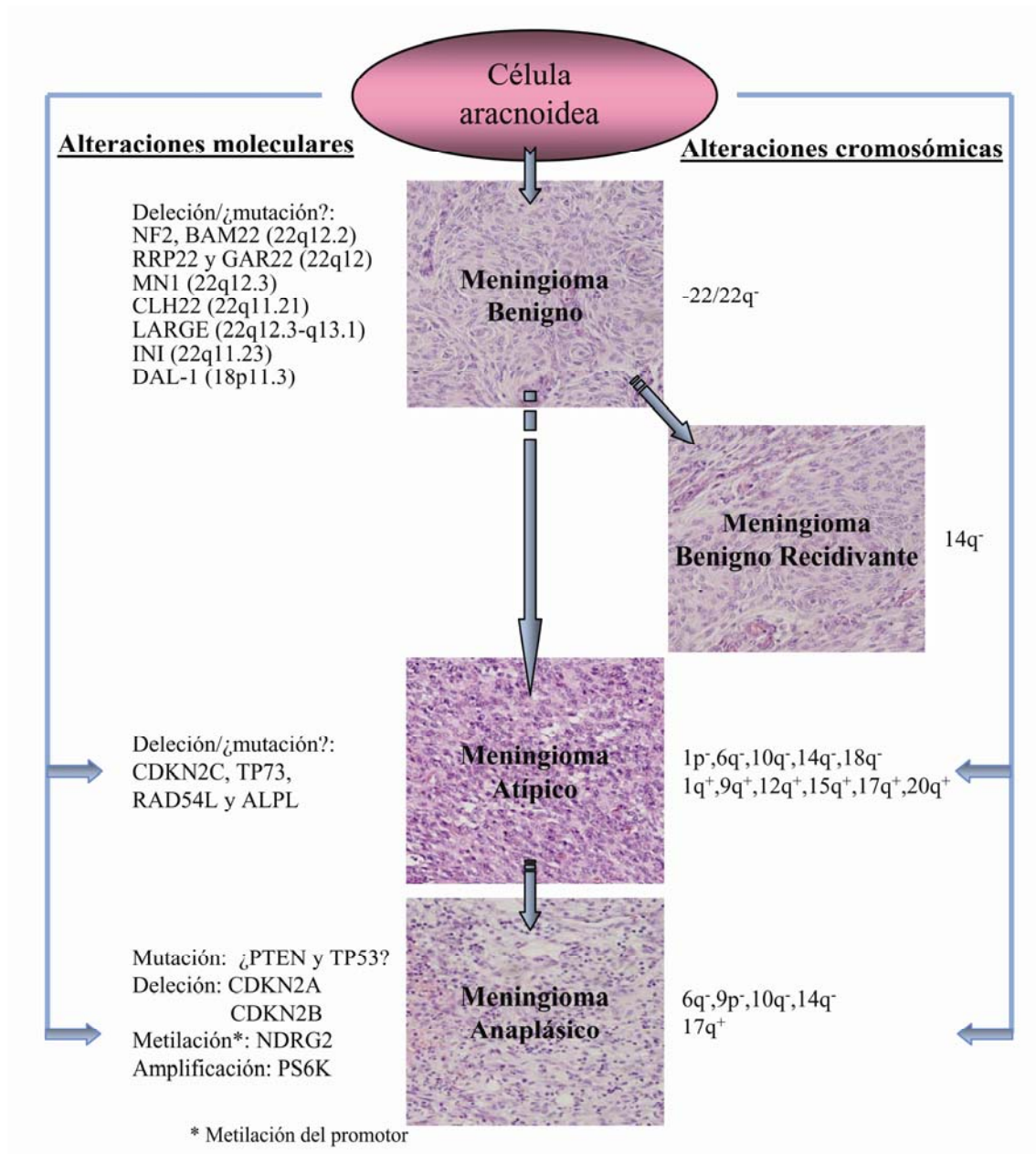


Figura 1. Modelo hipotético de progresión tumoral según los cambios genéticos/moleculares asociados a distintos subtipos histopatológicos de meningiomas, descritos en la literatura^{35,53,91,108,110,112,120,122,124,128-134}.

Recientemente, se ha propuesto un modelo complejo de progresión citogenética basado en algoritmos matemáticos que describen en árboles oncogénicos, el orden en el que se acumularían las diferentes alteraciones genéticas a lo largo de la progresión tumoral¹³⁶. Ketter et al¹³⁷ han empleado este modelo para definir los patrones de evolución clonal en 661 meningiomas en los que disponían de estudios citogenéticos convencionales. Así, sugieren que el evento citogenético más temprano correspondería a la monosomía 22 seguida de la del(1p) y la pérdida de un cromosoma 14, siendo este modelo característico de los meningiomas que ocurren en mujeres; por el contrario, en los varones, a la pérdida del cromosoma 22 le seguiría la monosomía 14 y, a continuación, la del(1p) (Figura 2).

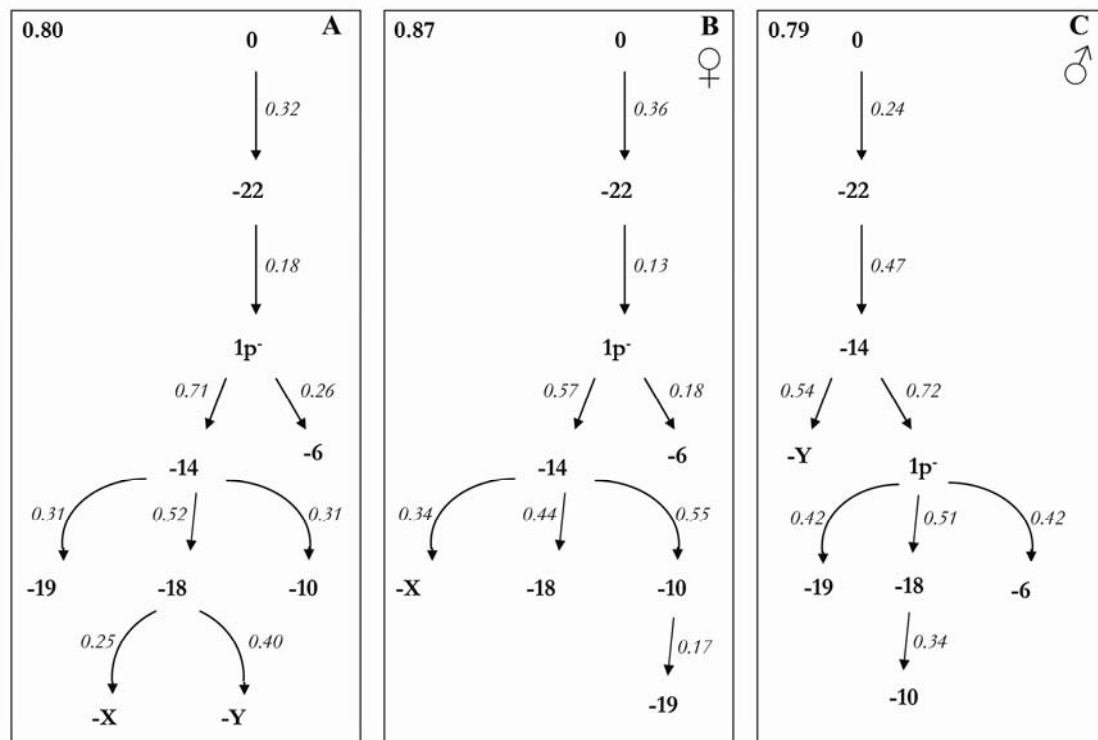


Figura 2. Modelo de árbol oncogénico generado por Ketter et al¹³⁷ donde se refleja la evolución clonal de 661 meningiomas (panel A) de los que 482 eran mujeres (panel B) y 179 varones (panel C). En la parte superior izquierda se indica el porcentaje de tumores que podrían explicarse según este modelo de árbol oncogénico y en cursiva se recoge la probabilidad de que se produzca una alteración genética, una vez haya sucedido el evento inmediatamente anterior.

En contraposición con estos modelos fundamentados en el análisis comparativo de diferentes tumores, nuestro grupo ha propuesto un modelo alternativo de progresión tumoral según los patrones citogenéticos detectados a nivel intratumoral en pacientes con meningiomas¹⁰⁷ (Figura 3). En este sentido, nuestros hallazgos sugieren la existencia de distintas vías de evolución clonal, que aún no siendo específicas de cada subtipo histológico, muestran una distribución claramente diferente en los grupos de meningiomas histológicamente benignos y atípicos/anaplásicos. Así, a modo de ejemplo, aunque la coexistencia de monosomía 14 y del(1p) constituye un marcador característico de la célula tumoral ancestral de los meningiomas histológicamente malignos, este tipo de patrón citogenético se detecta también en una pequeña proporción de los tumores histológicamente benignos; por el contrario, la pérdida del cromosoma 22 en la célula tumoral ancestral conduciría a una vía de progresión tumoral relativamente estable, característica de los meningiomas histológicamente benignos y ausente en los tumores atípicos y anaplásicos.

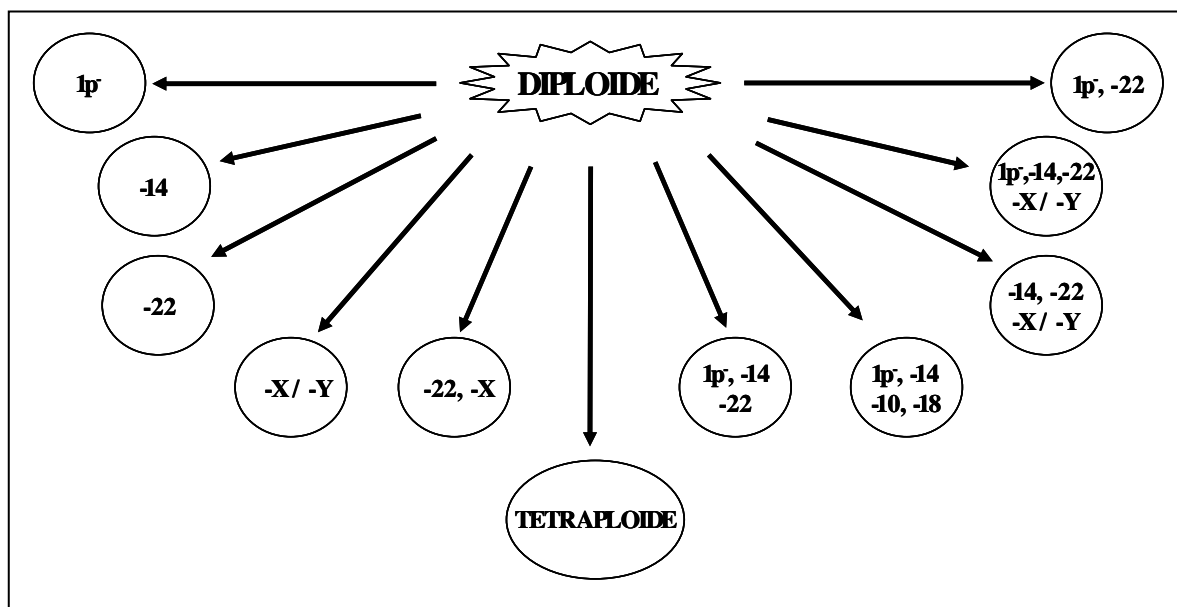


Figura 3. Heterogeneidad genética de los meningiomas: modelo hipotético de evolución clonal donde se muestran las alteraciones cromosómicas recurrentes (para 12 cromosomas estudiados) presentes en el clon tumoral ancestral¹⁰⁷.

De acuerdo con esta última hipótesis, diferentes autores han demostrado la existencia de una asociación significativa entre las alteraciones del gen NF2 (codificado en el cromosoma 22) y tanto la localización tumoral¹³⁸ como los subtipos histológicos más comunes de meningiomas benignos¹³⁹. Así, mientras que en los meningiomas fibroblásticos y transicionales se detecta la presencia de alteraciones del gen NF2 en aproximadamente 70-80% de los casos, en los meningiomas meningoteliosos, éstas se han descrito únicamente en un 25% de los tumores¹³⁹. De igual forma, la expresión de la proteína merlina también se encuentra anormalmente reducida en la mayoría de los meningiomas fibroblásticos y transicionales, mientras que su expresión es normal en el subtipo meningotelial^{140,141}. Estos hallazgos sugieren que el origen genético de los meningiomas meningoteliales podría ser independiente de la aparición de alteraciones genéticas en el gen NF2, a diferencia de lo que ocurriría en los meningiomas fibroblásticos y transicionales. Por otra parte, recientemente se ha referido la existencia de una mayor frecuencia de mutaciones del gen NF2 en meningiomas psamomatosos respecto a los tumores secretores¹⁴², lo que apoyaría la hipótesis de que las mutaciones en NF2 podrían jugar un papel más importante en las variantes de meningiomas con morfología mesenquimal, que en los tumores con fenotipo epitelial. Finalmente, merece destacar que los tumores de la base del cráneo son predominantemente meningoteliosos, mientras que los meningiomas fibroblásticos y transicionales se localizan sobre todo en la convexidad¹³⁸.

El hecho de que se observe una relación entre las alteraciones del gen NF2 y, tanto el subtipo histológico como la localización tumoral, podría indicar que existen varias vías genéticas de evolución clonal asociadas de forma preferencial a subtipos histológicos concretos y distintos patrones de localización tumoral. Este mismo concepto sería válido para algunas variantes histológicas de meningiomas de grado II y

III. Así, aunque seguimos sin conocer las características genéticas asociadas a los meningiomas de células claras (grado histológico II), se ha propuesto que la translocación no recíproca der(1)t(1;3)(p12-p13;q11) podría constituir un marcador citogenético específico de la variante cordoide (grado II)¹⁴³, sin que se hayan identificado de momento los genes implicados en este subtipo de meningioma. A su vez, los meningiomas malignos de tipo papilar constituyen un subtipo histológico raro que se observa fundamentalmente en niños; estos meningiomas suelen presentar invasión local del cerebro y otros tejidos (75% de los pacientes) y mal pronóstico, asociándose a elevadas tasas de recidiva y metástasis (55% y 20% de los casos, respectivamente)^{144,145}. Junto con los meningiomas de tipo rabdoide, los tumores papilares se consideran meningiomas asociados a progresión tumoral ya que habitualmente se presentan por primera vez en la recidiva¹⁴⁴⁻¹⁴⁷; hasta la fecha, siguen sin identificarse de forma específica las anomalías genéticas características de estos subtipos de meningiomas.

3.2.2.- Anomalías citogenéticas y moleculares del cromosoma 1 asociadas a progresión tumoral.

Desde el punto de vista citogenético, merecen especial destaque por su implicación en la progresión tumoral, las anomalías del cromosoma 1. En células diploides humanas normales, el cromosoma 1 contiene alrededor de 8% del total del material genético¹⁴⁸. Entre los meningiomas, la delección de la porción distal del brazo corto del cromosoma 1 constituye la segunda anomalía cromosómica en frecuencia, habiéndose relacionado su presencia con el sexo masculino y una mayor tasa de progresión tumoral y recidiva^{83,103,110,124,132,149-151}. Por ello, algunos autores sugieren que

la pérdida del cromosoma 1p podría constituir un paso decisivo en la progresión de los meningiomas¹⁵⁰.

En la práctica, la monosomía 1p/1p⁻ puede aparecer como una alteración única⁶⁹ o, más frecuentemente, asociada a otras alteraciones cariotípicas^{65,103,113}; su prevalencia aumenta progresivamente con el grado histológico del tumor, estando presente en 3-26% de los meningiomas de grado I, 60-87% de los tumores de grado II y 32-100% de los meningiomas de grado III^{83,122,132,149,150,152}. Estos hallazgos proporcionan una evidencia indirecta adicional de la posible implicación de genes codificados a nivel de 1p en la progresión de los meningiomas. No obstante, existe también un pequeño grupo de casos descritos en la literatura^{35,91,124,130}, donde se detecta la presencia de pérdidas a nivel del cromosoma 1p, sin que se observen signos histológicos de atipia. Estos hallazgos sugieren que al menos en este grupo de tumores benignos, la alteración del cromosoma 1p no sería suficiente para la progresión de los meningiomas; no obstante, no podemos descartar que estos casos puedan corresponder a pacientes en los que se ha realizado un diagnóstico temprano del tumor, de forma previa a la progresión histológica¹⁵⁰.

Dada la relevancia clínica de la monosomía 1/del(1p), diferentes autores han tratado de profundizar en la caracterización de las posibles anomalías moleculares subyacentes, que pudieran contribuir a explicar el comportamiento más agresivo de estos tumores. Así, Sulman et al¹⁵³ identificaron una región mínima de delección a nivel de 1p34, donde se localizan 17 genes candidatos. En paralelo, Bello et al¹⁴⁹ han descrito dos regiones principales de delección, a nivel de 1p34-p33 y 1p36. Con ello, en la actualidad se han identificado varios genes codificados en el brazo corto del cromosoma 1, en la región comprendida entre 1p32 y 1p36.32, que podrían estar involucrados en la progresión de los meningiomas. Entre ellos se incluyen los genes

CDKN2C (p18^{INK4c})^{112,154,155}, TP73^{105,155-158}, RAD54L^{153,159,160}, ALPL^{83,106,150,161,162} y EPB41¹⁶³. De estos genes, merece especial destaque el gen de la fosfatasa alcalina (ALPL) localizado en 1p36.1-p34. La ALPL es una enzima presente tanto en la membrana citoplasmática como en el citosol, muy activa en células aracnoideas normales y de meningiomas benignos¹², cuya actividad enzimática se encuentra significativamente reducida en meningiomas con del(1p)¹⁵⁰. En los meningiomas, la expresión funcional de la fosfatasa alcalina se ha relacionado con la capacidad de mineralización observada en este tipo de neoplasias y, al igual que ocurre con las deleciones de 1p, su pérdida de expresión se ha asociado con una mayor agresividad tumoral^{106,150,161,162,164}. No obstante, hasta la fecha siguen sin conocerse los mecanismos moleculares a través de los cuales la fosfatasa alcalina podría desempeñar un papel clave como gen supresor tumoral, en la patogenia de los meningiomas. Estudios de secuenciación genómica sostienen la hipótesis de que, durante la progresión maligna se produce una inactivación en dos pasos de este gen, consistente en la deleción seguida de metilación de su promotor¹⁵⁰. De forma similar, se ha descrito la existencia de metilación del promotor del gen TP73 en casi la mitad de los casos que presentan del(1p)¹⁶⁵, sin que se hayan observado mutaciones en este gen, como mecanismo de inactivación del mismo¹⁰⁵.

3.2.3.- Otras alteraciones genéticas/cromosómicas implicadas en la progresión tumoral.

Otras anomalías genéticas/cromosómicas que se asocian con la progresión tumoral de los meningiomas incluyen las alteraciones de los cromosomas 14q^{35,108,110,124,128,131}, 9p^{122,166}, 10q^{37,117} 122,124y 17q^{122,127}.

Desde el punto de vista citogenético, la pérdida del cromosoma 14 representa la tercera anomalía cromosómica más frecuentemente detectada en meningiomas, detrás de las alteraciones de los cromosomas 22 y 1p⁸³. Al igual que esta última alteración, la monosomía 14 se ha asociado con un peor pronóstico, sin que se hayan identificado en este cromosoma genes candidatos, a la hora de explicar el comportamiento más agresivo del tumor.

Por otra parte, hoy se conoce que la frecuencia de del(10q) se incrementa de forma paralela con el grado histológico^{37,117}, desde los tumores de grado I (5-12% de los casos), a los de grado II (29-40%) y III (40-58% de los tumores)^{122,124,167,168}, asociándose además, con una menor supervivencia libre de recidiva y supervivencia global de los pacientes³⁷. La región cromosómica comprendida entre 10q23-q25 alberga 3 genes – PTEN, MXI1 y DMBT1– susceptibles de actuar como genes supresores de tumor en meningiomas y que han sido investigados como posibles genes diana en las deleciones observadas en meningiomas histológicamente avanzados. De ellos, merece especial atención el gen PTEN (MMAC1), localizado a nivel de 10q23.3 e involucrado en la patogénesis de otros tumores^{169,170}, ya que este gen podría intervenir también en la progresión tumoral de los meningiomas¹⁶⁷; no obstante, al igual que ocurre con los genes MXI1 y DMBT1¹⁷¹, las mutaciones somáticas del gen PTEN son relativamente infrecuentes entre los meningiomas^{134,167,168}.

A su vez, se ha descrito una frecuencia relativamente elevada de deleciones del cromosoma 9 en meningiomas anaplásicos, mientras que estas anomalías apenas se detectan en los meningiomas histológicamente benignos^{122,166}. En relación con este último cromosoma, debe señalarse que en su brazo corto, a nivel de 9p21, se localizan un grupo de genes supresores de tumor –CDKN2A (p16^{INK4a}/MTS1/p14^{ARF}) y CDKN2B (p15^{INK4b}/MTS2)^{112,166,172-174}– que codifican para proteínas que actúan como

inhibidores del ciclo celular, y que con frecuencia están inactivados/delecionados en otros tipos de tumores humanos¹⁷⁵. Entre los meningiomas se ha descrito la existencia de deleciones homocigóticas de 9p21 en casi la mitad de los tumores de grado III, mientras que sólo se detectan en una minoría ($\leq 3\%$) de los meningiomas histológicamente benignos¹¹². De forma similar, empleando técnicas de CGH, análisis de LOH e iFISH, se han descrito deleciones a nivel del cromosoma 9p en 40%-75% de los meningiomas anaplásicos, 20%-52% de los tumores atípicos y en alrededor de 5%-17% de los meningiomas histológicamente benignos o de grado I^{112,166}.

El gen supresor de tumor TP53, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, constituye uno de los genes más frecuentemente alterados en diferentes tipos de tumores sólidos¹⁷⁶; por el contrario, las mutaciones de TP53 son poco habituales en los meningiomas^{134,177-181}. Sin embargo, se ha constatado la existencia de pérdida de función de p53 en meningiomas, donde se asocia a progresión tumoral¹⁸²; esta alteración funcional podría ocurrir a través de un mecanismo alternativo mediado por metilación de p14^{ARF} y aumento de la expresión de MDM2¹⁸². De forma similar, las alteraciones citogenéticas que afectan al brazo largo del cromosoma 17, se han relacionado también con progresión tumoral¹²². De todas ellas, la amplificación de 17q constituye la anomalía más frecuentemente detectada en meningiomas, estando presente en >40%-60% de los tumores anaplásicos¹²², en alrededor de 20% de los meningiomas atípicos y en cerca de 14% de los tumores histológicamente benignos¹²⁷. Los patrones de amplificación de 17q descritos hasta la fecha, definen regiones comunes, una de las cuales englobaría el proto-oncogén PS6K, localizado a nivel de 17q23¹⁸³. No obstante, esto no ha podido ser confirmado en otros estudios¹³³ que han encontrado amplificación de PS6K en menos del 15% de los meningiomas anaplásicos y en ninguno de los meningiomas benignos (n=37) y atípicos (n=35) analizados. De acuerdo

con estos hallazgos, estudios moleculares adicionales sugieren que, el gen PS6K estaría fuera de la región de 17q que presenta mayor grado de amplificación en los meningiomas de grado III¹²⁷. Independientemente de la ubicación o no del gen PS6K en la región de 17q amplificada en los meningiomas anaplásicos, algunos análisis han demostrado la existencia de sobreexpresión de PS6K a nivel de ARNm en meningiomas anaplásicos, en los que podría conferir una mayor ventaja proliferativa¹⁸⁴.

Aunque en menor frecuencia que las alteraciones cromosómicas referidas anteriormente, en los meningiomas también se han descrito pérdidas a nivel de los cromosomas 3p, 5, 6q, 7 –incluye la del(7p) asociada a radiación–, 8, 11, X e Y, y ganancias que afectan a los cromosomas 1q, 9q, 12q, 15q y 20q^{91,104,122,185-187}. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la proteína TSLC1 –codificada en la región 11q23.2 y expresada en las leptomeninges normales–, con relativa frecuencia estaría subexpresada en meningiomas atípicos y anaplásicos con elevado índice proliferativo, sugiriendo que esta proteína podría desempeñar un importante papel en el control del ciclo celular y del crecimiento tumoral, tanto en células meníngeas normales como tumorales¹⁸⁸.

3.3.- IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS.

La existencia de cambios citogenéticos directamente relacionados con la agresividad biológica y el pronóstico de los meningiomas, es un dato ampliamente referido en la literatura^{34,65,72,83,91,122}. Así, la citometría de flujo muestra que los tumores aneuploides se asocian con una mayor tasa de recurrencia, mayor pleomorfismo, una alta densidad celular, mayor número de mitosis y un mayor porcentaje de casos con infiltración cerebral y de tejidos blandos^{12,189}. Además, estudios preliminares han

encontrado una relación estadísticamente significativa entre la ploidía de ADN y el pronóstico de los meningiomas^{190,191}; de acuerdo con ello, se ha observado también que la presencia de cariotipos complejos se asocia con un mayor riesgo de recaída y peor pronóstico^{34,83,122}, incluso dentro de los tumores histológicamente benignos¹³². Sin embargo, la asociación entre ploidía de ADN y el pronóstico de los meningiomas no siempre ha podido confirmarse¹⁹² y parece depender, más que de la cantidad global de ADN o del número de alteraciones cromosómicas de la célula tumoral, de las anomalías genéticas concretas presentes en ella.

En la actualidad, siguen siendo relativamente escasos los trabajos en los que se explora y demuestra de forma fehaciente la asociación entre el tipo de alteraciones genéticas concretas de la célula tumoral y el pronóstico de los meningiomas. Así, en la mayoría de los estudios referidos en la literatura se ha analizado el impacto pronóstico de la monosomía del cromosoma 22/22q^{-67,70,113}, sin que se haya podido demostrar una asociación clara entre la pérdida de una copia del cromosoma 22/22q y el comportamiento clínico, biológico y pronóstico de la enfermedad, a excepción de una mayor incidencia de tumores localizados en la convexidad¹³⁸ y de los subtipos histológicos fibroblástico, transicional y psamomatoso^{138,139,142}. Por el contrario, las ganancias del cromosoma 22 en forma de trisomía y tetrasomía 22, presentes en alrededor de 10% de los casos, se han asociado con características adversas de la enfermedad^{99,193-195}, entre las que se incluyen una menor edad, subtipos histológicos más agresivos (grado II/III), tumores aneuploides, mayor tasa proliferativa de las células tumorales y una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta¹⁹³. Estos resultados coinciden con observaciones previas de otros autores^{127,196,197} que indican que los meningiomas que muestran cariotipos complejos con ganancias de

varios cromosomas incluido el cromosoma 22¹⁹⁴, estarían asociados con características adversas de la enfermedad y un curso clínico más agresivo.

De entre las demás anomalías genéticas que se han asociado a menor supervivencia libre de recaída, merece destacar la monosomía 14^{198,199} y/o la del(1p)^{137,151,162,199}. En este sentido, hallazgos de diferentes autores sugieren que la progresión maligna de los meningiomas podría estar asociada con el acúmulo secuencial de alteraciones en estos cromosomas^{110,200,201}, detectándose un mayor porcentaje de pérdidas de ambos cromosomas entre los meningiomas histológicamente más agresivos (grado II/III)^{124,137}. De acuerdo con estos hallazgos, Ketter et al¹³⁷ al emplear el sistema de puntuación de Rahnenfurer et al.²⁰² para definir progresión genética (GPS; del inglés: “*Genetic Progression Score*”) de 661 meningiomas, constataron la existencia de una correlación inversa entre valores elevados de GPS –que reflejan un grado más elevado de acumulo de alteraciones genéticas– y una menor supervivencia libre de recaída. Además, en el análisis univariante, estos autores destacan el pronóstico adverso, a título individual, de las pérdidas de los cromosomas 14, 18 y 10, además de la del(1p), constituyendo esta última alteración la única anomalía cromosómica con valor pronóstico independiente en el análisis multivariante.

Respecto a la del(1p), se han referido diferentes tasas de recidiva según el grado histológico del tumor, oscilando éstas entre 7 y 20% en meningiomas benignos, entre 29 y 40% en los tumores atípicos y entre 50 y 78% en meningiomas anaplásicos que presentan del(1p)^{54,55,103}. Pese a esta asociación, Kim et al¹⁶² han demostrado que la del(1p) podría constituir un factor pronóstico independiente del grado histológico. La fuerte correlación observada entre la pérdida de función de la enzima ALPL y la presencia de del(1p), se ha sugerido podría reflejar que el gen ALPL pudiera actuar como gen supresor de tumor en los meningiomas, en los que un alelo deletado

coexiste con otro alelo mutado o silenciado¹⁵⁰, asociándose además la pérdida de función de la fosfatasa alcalina con una mayor tasa de recurrencia, en el análisis univariante¹⁶⁴.

Asimismo, las ganancias (trisomía o tetrasomía) de los cromosomas 1, 9, 10, 11, 15 y 17, además de la trisomía/tetrasomía 22, también se han asociado a título individual, con un peor pronóstico; no obstante, estas alteraciones habitualmente pierden su valor predictivo respecto a la recaída, en el análisis multivariante^{150,198,203}. De forma similar, algunos estudios han sugerido que las pérdidas de los cromosomas 9p y 10q, así como la inactivación de la telomerasa, podrían tener un impacto pronóstico adverso entre los meningiomas, asociándose la presencia de cualquiera de estas alteraciones con una mayor frecuencia de recidivas^{37,204,205} y la del(9p) –y/o las alteraciones de los genes CDKN2A y CDKN2B– con tumores anaplásicos y, dentro de éstos, con una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta^{112,122,166,173,206}. Además, las pérdidas de los cromosomas 1p, 9p, 10q y 14q, en combinación con la inactivación de la telomerasa, identificarían dentro de los meningiomas con cariotipo complejo, aquellos casos que se asocian a un peor pronóstico, pudiendo contribuir a complementar la información predictiva asociada al grado histopatológico del tumor respecto a la supervivencia libre de recaída. Otras cromosomopatías, como las asociaciones teloméricas o los dobles minutos, presentes predominantemente en meningiomas poco agresivos^{91,130,207}, son menos frecuentes, sin que se haya demostrado/analizado su impacto pronóstico.

Respecto a las características concretas de los meningiomas recidivantes, aunque los estudios referidos en la literatura son relativamente limitados, en la mayoría de los casos se observan cariotipos complejos²⁰⁸⁻²¹¹.

3.4.- ALTERACIONES GENÉTICAS DEL CROMOSOMA 14.

El cromosoma 14 pertenece al grupo de cromosomas acrocéntricos, constituyendo el cuarto cromosoma humano en conocerse su secuencia genética²¹², tras los cromosomas 22, 21 y 20, respectivamente²¹³⁻²¹⁵. Así, hoy sabemos que el cromosoma 14 contiene más de 600 genes y está fuertemente implicado en la patogénesis de múltiples enfermedades²¹⁶⁻²¹⁹, entre las que se incluyen también algunos tumores sólidos^{73,220-228}.

En los meningiomas, con relativa frecuencia se observa pérdida de material genético del cromosoma 14, ya sea de forma aislada o formando parte de cariotipos complejos, habitualmente hipodiploides⁸³. Desde que en 1986 se describiera por primera vez la pérdida del cromosoma 14 en meningiomas⁷³, varios autores, empleando técnicas citogenéticas convencionales, han constatado que las anomalías recurrentes que afectan al cromosoma 14 son heterogéneas, consistiendo principalmente en pérdidas totales o parciales –monosomía o del (14q)– de este cromosoma; con menor frecuencia, se observan también reordenamientos estructurales de este cromosoma, que habitualmente incluyen translocaciones^{65,73,99,113,118,151,200,211,229-232}. De ellas merece destacar la t(1;14) y la t(14;22)^{65,99,113,118,151,200,211,230}, anomalías que de forma característica se asocian también a pérdidas de material genético del cromosoma 14. En estas translocaciones, los puntos de ruptura suelen afectar además, a las regiones 14q11 y 14q32, lo que sugiere la posible implicación en el proceso de transformación neoplásica de locis genéticos localizados a estos niveles, comunes a los involucrados en otros tumores sólidos como el neuroblastoma²²⁰, el cáncer de mama²³³ y de ovario²³⁴, los astrocitomas²³⁵, el retinoblastoma²³⁶ y el melanoma²³⁷. Aunque, con menor frecuencia,

en la literatura también se ha descrito la existencia de ganancias –trisomía y tetrasomía– del cromosoma 14 en una pequeña proporción de meningiomas¹¹⁵.

Con el fin de definir y caracterizar mejor las alteraciones concretas que afectan al cromosoma 14 en meningiomas, además de las técnicas citogenéticas convencionales, en la actualidad disponemos de un amplio abanico de aproximaciones metodológicas, de las que merece destacar la CGH⁷⁵, la iFISH⁷⁰ y la determinación de la LOH¹²⁴, entre otras. Gracias al empleo de estas técnicas complementarias, se ha podido confirmar la presencia de alteraciones en el cromosoma 14 en entre 10% y 65% de los meningiomas^{34,35,65,73,83,99,108,110,115,118-120,122,124,128,129,131,150,151,186,194,200,211,229-231,238-242}.

Además, hoy sabemos que en la mayoría de los tumores que presentan deleciones en 14q, éstas corresponden a pérdidas completas de todo el cromosoma –monosomía 14–, habiéndose identificado en algunos casos regiones comunes de deleción especialmente relevantes. De ellas, merece destacar la región 14q24.3-q32.33, señalada por Simon et al¹²⁴ como la región crítica, involucrada en las pérdidas del cromosoma 14 en los meningiomas. Estos hallazgos han sido corroborados posteriormente por otros autores^{108,120,122,131} que sugieren que podrían existir dos regiones mínimas de deleción: una se localizaría a nivel de 14q21-q24, mientras que la otra se situaría hacia el telómero del brazo largo del cromosoma 14, en 14q32-qter. Esta última región contendría al menos tres oncogenes potencialmente relevantes, cuyo papel como genes supresores de tumor está aún por dilucidar: 1) ELK-2, que es un miembro de la familia de oncogenes ETS; 2) AKT, un gen clave en distintas vías de señalización intracelular y que se encuentra amplificado en adenomas gástricos, y; 3) el oncogen TCL-1. Así, el conocimiento detallado de las deleciones parciales que ocurren en los meningiomas, junto con los hallazgos derivados de otras neoplasias que muestran pérdidas en el cromosoma 14q^{222-225,227,228}, apoyarían la existencia de varias regiones que

pudieran alojar genes supresores de tumor en este cromosoma y que estarían localizadas a nivel de 14q12-q21, 14q22-q24 y 14q32-qter^{131,228}.

Pese a todos estos estudios, hasta la fecha no se ha logrado identificar ningún gen supresor tumoral localizado en el brazo largo del cromosoma 14, que esté directamente implicado en la progresión de los meningiomas. Aún así, estudios recientes en los que se analizan los patrones de expresión genómica en meningiomas²⁴³, sugieren que alteraciones en la región 14q11.2, en la que se localiza el gen NDRG2, podrían contribuir a explicar la mayor tasa de progresión tumoral asociada a meningiomas histológicamente malignos, dado que este gen se encuentra infraexpresado y su promotor metilado, en meningiomas anaplásicos. En condiciones normales, NDRG2 se expresa en el tejido cerebral, cardíaco y muscular, encontrándose implicado en el crecimiento²⁴⁴, diferenciación²⁴⁵ y muerte por apoptosis de las células de estos órganos²⁴⁶. Recientemente, se ha demostrado también la expresión de NDRG2 en su forma activa en el tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer²⁴⁷, con lo que, además de tener un papel en el crecimiento celular, este gen podría estar implicado en mecanismos neurodegenerativos.

3.4.1. Mecanismos implicados en la pérdida de material genético del cromosoma 14 en meningiomas.

En términos generales, la aneuploidía está a menudo asociada a inestabilidad cromosómica, definida por un aumento en la tasa de pérdida o ganancia de cromosomas enteros, o de partes extensas de éstos, durante la división celular. Las consecuencias de esta inestabilidad son un desequilibrio entre el número de cromosomas y/o un aumento en la tasa de LOH que acelera la inactivación de genes

supresores de tumor, caso se asocie a fenómenos de mutación, delección y/o metilación del otro alelo y/o de su promotor. Los mecanismos que contribuyen a la inestabilidad cromosómica característica de células tumorales, y que por tanto favorecen la pérdida de material cromosómico, se asocian fundamentalmente a tres tipos de alteraciones: 1) anomalías de las proteínas que participan en el control de la mitosis, especialmente en la segregación cromosómica; 2) déficit de proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del ADN, y; 3) alteraciones en la funcionabilidad de los centrómeros y telómeros. Entre ellas se incluyen alteraciones asociadas a mutación, translocación y metilación de ADN y los polimorfismos genéticos. En la tabla 2 se recogen a modo de listado algunos genes que intervienen en la generación de inestabilidad cromosómica al estar implicados en alguno de estos procesos.

Tabla 2. Genes que intervienen en la regulación de la estabilidad cromosómica y cuya alteración se relaciona con la presencia de aneuploidía^{248,249}.

Región	Gen*	Función
1p34.2-p33	CDC20	Activa el complejo APC/C encargado del inicio de la anafase.
1q25.3	Securina	Activa la enzima separasa en el inicio de la anafase.
2q14	BUB1	Forma un complejo con Mad1 y Bub3.
4q24-q24	CENP-E	Activa a la proteína BubR1.
4q24-q25	CENP-A	Participa en el ensamblaje del cinetocoro.
4q27	MAD2	Se une a CDC20 e inhibe el complejo APC/C ^{Cdc20} .
7p22	MAD1	Se une a Mad2 y lo recluye en los cinetocoros.
Cr 8	Separasa	Da comienzo a la separación de las cromátidas hermanas.
8q24	SCC1	Forma parte del complejo de la cohesina y su rotura da comienzo a la separación de las cromátidas hermanas.
Cr10	ZWINT	Incorpora ZW10 al cinetocoro.
10q24-q26	BUB3	Se une a Bub1 y BubR1.
Cr11	ZW10	Proteína de control de la mitosis que se localiza en el cinetocoro.
15q15	BUBR1	Inhibe el complejo APC/C ^{Cdc20} .
Cr17	KNTC1	Interacciona con ZW10.
Cr17	MIS12	Participa en la correcta colocación de los cromosomas en la anafase.
20q13.2-q13.3	Aurora2/STK15	Participa en la maduración del centrosoma y el ensamblaje del huso mitótico.
1p32	RAD54L	Disocia a Rad51 de los filamentos nucleoproteicos formados en la doble cadena de ADN.
1p34-p12	GADD45A	Estimula la reparación del ADN inhibiendo la entrada en fase S.
2q35	Ku80	Forma un heterodímero con Ku70, une los extremos del ADN, recluta y activa la DNA-PKcs.

Región	Gen*	Función
3q22-q24	ATR	Mecanismo de control serin/treonin kinasa.
3q27	RFC4	Forma parte de un complejo proteico encargado de detectar daño en el ADN.
5q31	RAD50	Sensor de daño en el ADN; forma un complejo con Mre11/Nbs1.
6p21.2	CDKN1A	Inhibe la actividad CDK; está regulada por p53 actuando como proteína efectora en el control del ciclo celular.
7q11.23	RFC2	Forma parte de un complejo proteico encargado de detectar daño en el ADN.
7q36.1	XRCC2	Promueve la formación del complejo de Rad51 y la segregación cromosómica.
8q21	NBS1	Sensor de daño en el ADN; forma un complejo con Mre11/Rad50.
9q22.1-q22.2	GADD45G	Participa en el bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M e induce apoptosis.
Cr10	SIRT1	Interacciona con p53 atenuando su función.
11q21	MRE11	Forma parte del complejo proteico MRE; tiene actividad exonucleasa, endonucleasa y helicasa.
11q22-q23	CHK1	Kinasa que activa p53 y otras proteínas relacionadas con p53 que participan en la respuesta a daño en el ADN.
12p13-p12.2	RAD52	Aumenta la actividad de Rad51; une extremos de la doble hélice del ADN.
12q24.3	POLE	Polimerasa involucrada en la reparación del ADN.
13q12.3	BRCA2	Interviene en la formación del complejo de Rad51 en la reparación de ADN.
13q14.1-q14.2	Rb	Gen supresor tumoral; regulador negativo del ciclo celular por unión a factores de transcripción.
13q33	ERCC5	3' endonucleasa.
14q23.3-q24	RAD51B	Promueve la formación del complejo de Rad51.
14q32.3	XRCC3	Ayuda a Rad51; tiene actividad resolvasa.
15q15.1	RAD51	Es una transferasa de la hebra de ADN.
17p13.1	TP53	Gen supresor tumoral; regula genes que intervienen en la detención del ciclo celular, la apoptosis, senescencia, reparación de ADN y/o cambios en el metabolismo celular.
17p13.3	RPA1	Une ADN de cadena única; necesario para la incorporación de ATR a regiones dañadas de ADN.
17q	RAD51C	Ayuda a Rad51; tiene actividad resolvasa.
17q21	BRCA1	Interviene en la formación del complejo de Rad50 para reparación de ADN.
19q13.3-q13.4	POLD1	Polimerasa implicada en la reparación y replicación de ADN.
20p12	PCNA	Subunidad delta de la ADN polimerasa; interviene en la reparación de ADN.
22q11-q13	Ku70	Forma un heterodímero con Ku80; une extremos de ADN; recluta y activa la DNA-PKcs.
22q12.1	CHK2	Kinasa que actúa como proteína efectora de ATM.
1q42	PARP-1	Proteína que cataliza la poli-ADP-ribosilación de distintos sustratos proteicos; detecta regiones con roturas de ADN en una única cadena.
Cr8	Tankyrasa-1	Proteína con actividad PARP que interviene además en la estabilidad telomérica.
8p12-p11.2	WRN	Proteína con actividad helicasa y 3'-exonucleasa; interviene en la reparación del ADN y la estabilidad telomérica.
8q11	DNA-PKcs	Subunidad catalítica de la proteína kinasa ADN-dependiente; participa en la reparación de ADN y en la estabilidad telomérica.
10q23	Tankyrasa-2	Proteína con actividad PARP que interviene además en la estabilidad telomérica.
11q22.3	ATM	Proteína con actividad kinasa; interviene en el control del daño en el ADN.

Región	Gen*	Función
14q11.2	PARP-2	Proteína con actividad similar a PARP-1.
15q26.1	BLM	Proteína con actividad helicasa.
16p13.3-p13.13	XPF	Proteína con actividad 5'-endonucleasa.
17q11	RAD51L3	Interviene en la reparación de ADN de doble cadena y en el mantenimiento de los telómeros.
19q13.2-q13.3	ERCC1	Forma complejo con XPF.
Cr7	POT1	Controla la elongación de los telómeros mediada por la telomerasa.
8q13	TRF1	Regula la longitud de los telómeros.
Cr16	RAP1	Regula negativamente la longitud de los telómeros.
16q22.1	TRF2	Regula la longitud de los telómeros.
16q22.1	TPP1	Incorpora a POT1 en los telómeros.

*Sombreado en verde se muestran los genes relacionados con la segregación cromosómica durante la mitosis; en amarillo, se resaltan los genes responsables de la reparación adecuada de la doble cadena de ADN; en rosa, se destacan los genes que participan tanto en la reparación de ADN como en el mantenimiento de la estabilidad telomérica, por último; en azul, se describen algunos de los genes que regulan la estabilidad telomérica.

3.4.1.1.- Alteraciones de la segregación cromosómica durante la mitosis.

Durante la mitosis, el movimiento de los cromosomas por el huso mitótico está regulado por el centrómero a cuya superficie se ensambla el cinetoro, actuando como punto de anclaje de los microtúbulos del huso mitótico; con la disyunción mitótica se produce la separación, normalmente simétrica, de los cromosomas o cromátidas hacia los polos opuestos de la célula. La separación asimétrica o no-disyunción mitótica de los cromosomas o cromátidas en la última fase de la mitosis, o el retraso en su movimiento en la anafase, hacen que se produzca una distribución asimétrica de los mismos generando células con una dotación cromosómica alterada, entre las que se incluyen células hipodiploides para el(los) cromosoma(s) afectado(s) (Figura 4) ²⁵⁰.

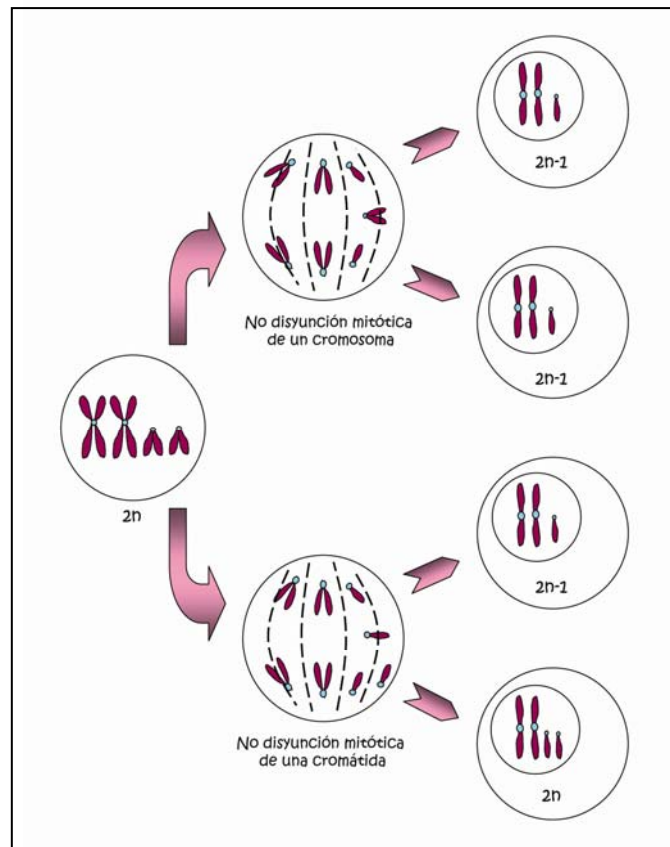


Figura 4. Esquema representativo del proceso de no-disyunción mitótica, como mecanismo responsable de la generación de clones de células tumorales asociadas a monosomía(s). $2n$ correspondería a una dotación cromosómica diploide normal, y; $2n-1$ representaría una dotación cromosómica con pérdida de un cromosoma respecto a un cariotipo diploide.

Los mecanismos moleculares responsables de una segregación cromosómica adecuada, están controlados por proteínas que se expresan y/o activan al inicio de la anafase²⁴⁸. Previamente a esta etapa, existen dos mecanismos responsables de la cohesión entre las cromátidas hermanas: 1) cohesión mediada por concatenaciones entre las hebras hijas de ADN que surgen durante el periodo replicativo como consecuencia de la estructura helicoidal del ADN, y; 2) cohesión mediada por un complejo multiproteico denominado cohesinas que forma un anillo que rodea a las hebras hijas de ADN²⁵¹; otras proteínas necesarias para una adecuada cohesión de las

cromátidas hermanas incluyen las acetil-transferasas y las proteínas de unión a la cohesina²⁵².

En la transición entre la metafase y la anafase, se activa de forma secuencial el complejo proteico APC/C (complejo promotor de la anafase/ ciclosoma) mediante la proteína Cdc20²⁴⁸; este complejo proteico es el encargado de captar las proteínas inhibidoras de la anafase y las proteínas reguladoras de la mitosis, con el fin de producir la ubiquitinización de las mismas y su posterior degradación por el proteosoma²⁵³. La regulación de la proteólisis mediada por APC es esencial a la hora de generar la transición irreversible entre diferentes etapas de la mitosis (metafase y anafase), mediante la destrucción de moléculas críticas en la regulación de la misma²⁵⁴. Dentro de los sustratos de APC se incluyen las ciclinas mitóticas (ciclina A y B), las quinasas dependientes de ciclina (CDK1) y la proteína inhibidora de la anafase, securina²⁵⁴. Los complejos ciclina B1-CDK1 se acumulan en el citoplasma durante la interfase y son rápidamente activados y translocados al núcleo al comienzo de la mitosis, asociándose al huso mitótico en la metafase. La ciclina B1 se degrada por la actividad de la proteína APC en la transición entre metafase y anafase, causando la inactivación de CDK1 y la finalización de la mitosis²⁵⁵. El complejo proteico APC/C^{Cdc20} realiza la ubiquitinización de la proteína securina. A su vez, la degradación de esta proteína activa a la separasa que induce la proteólisis de una de las subunidades del complejo de la cohesina, la proteína Scc1, permitiendo así el inicio de la segregación cromosómica²⁴⁸ (Figura 5).

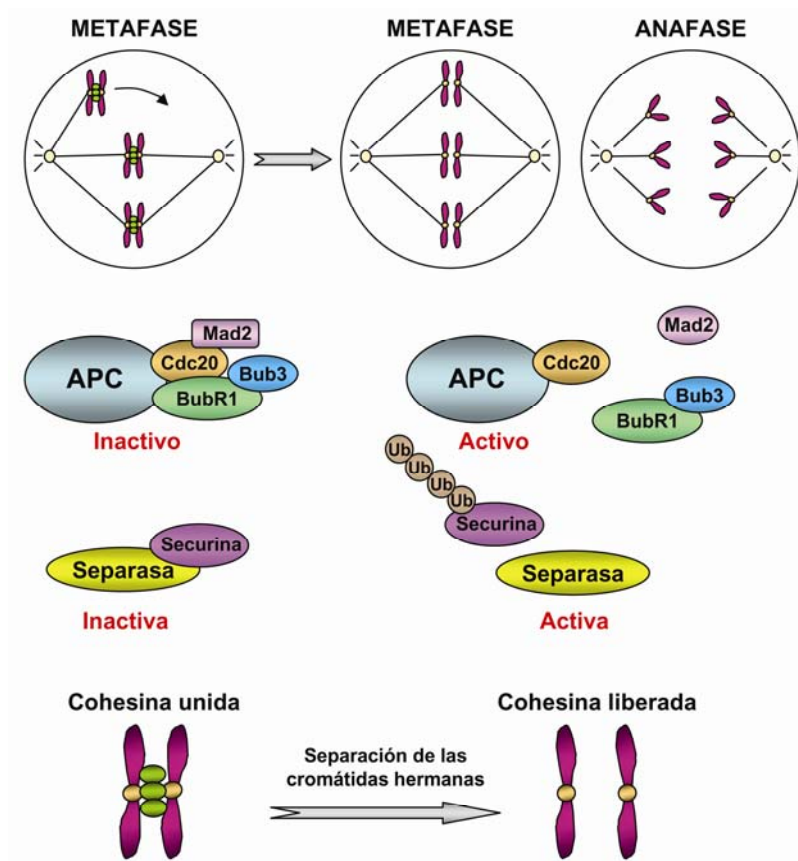


Figura 5. Esquema representativo de los mecanismos moleculares implicados en la segregación cromosómica durante diferentes etapas de la mitosis.

Caso exista un acoplamiento inadecuado de cromátidas hermanas, los mecanismos de control del huso mitótico promueven el ensamblaje de complejos proteicos que inhiben la actividad del complejo APC/C, lo que conduce a una estabilización de la securina y la cohesión de cromátidas hermanas, promoviendo un retraso en el comienzo de la anafase²⁵⁶. La existencia de anomalías funcionales en estas proteínas o en sus mecanismos de control, ocasiona una formación y actuación inadecuada del huso mitótico, conduciendo a una alteración de la segregación cromosómica y a la presencia de aneuploidía²⁴⁸.

3.4.1.2. Alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN.

La existencia de alteraciones genéticas intra o intercromosómicas está relacionada también con la generación de daño en el ADN y/o su reparación²⁵⁷. En general, las células humanas disponen de dos mecanismos principales para la reparación del daño en el ADN asociado a rotura de la doble hélice; así, la célula puede emplear mecanismos de reparación en los que se produce: 1) unión de extremos no homólogos (NHEJ; del inglés: “*non-homologous end-joining*”), y; 2) recombinación homóloga²⁴⁹. Los mecanismos de recombinación del ADN, junto con la capacidad de mutar, son responsables de la aparición de gran parte de los cambios genéticos que han permitido la evolución de las especies. No obstante, en células tumorales estos mecanismos serían responsables también de mutaciones, polimorfismos genéticos y anomalías cromosómicas²⁵⁸.

La recombinación de ADN es un proceso complejo mediante el cual se reparan roturas en sus hebras. Estas roturas pueden producirse de forma espontánea o como consecuencia de la respuesta celular a múltiples factores endógenos y/o exógenos²⁴⁹, ocurriendo en interfase, durante la duplicación de la molécula de ADN o en el desplazamiento de los cromosomas en la mitosis. En cualquiera de estos periodos, la propia célula controla el proceso de reparación de ADN mediante síntesis y activación de enzimas específicas encargadas de llevar a cabo esta función. Así, en respuesta al daño en el ADN, las proteínas ATM y ATR, entre otras, activan mediante fosforilación y/o cambios conformacionales a otras proteínas encargadas de la reparación de la rotura de la doble hélice²⁵⁹. En el caso de la recombinación por NHEJ, en un primer paso se requiere que el heterodímero Ku70/Ku80 forme un anillo capaz de unirse de forma específica a los extremos del ADN roto. Una vez formado el complejo ADN-

Ku, éste recluta y activa la proteína kinasa dependiente de ADN, DNA-PKcs, encargada de acercar los extremos de ADN²⁶⁰. Posteriormente, y si no se requiere de más procesamiento de los extremos del ADN, este complejo atraerá a otras proteínas como LIG4, XRCC4 y XLF, encargadas de formar un complejo con actividad ligasa que sellará los extremos del ADN²⁶⁰ (Figura 6).

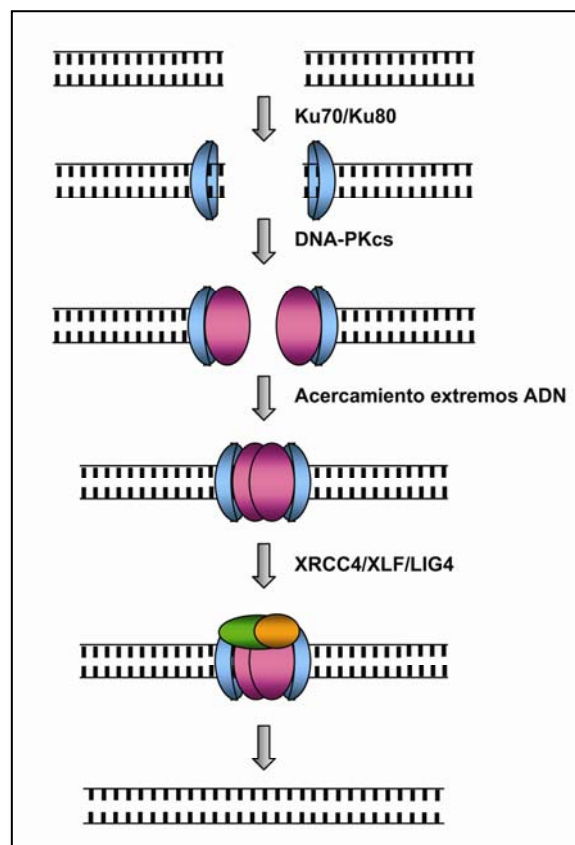


Figura 6. Representación esquemática de las diferentes etapas de reparación de rotura en la doble hélice de ADN mediante NHEJ.

Otro complejo proteico asociado a roturas de ADN que actúa también como sensor de daño facilitando la unión de los 2 extremos del ADN, es el complejo MRE formado por las subunidades proteicas MRE11, RAD50 y NBS1^{261,262}.

A su vez, en la reparación de la doble hélice mediante recombinación homóloga se requiere el procesamiento de los extremos rotos de ADN de forma previa a su

unión; para ello, la célula emplea la actividad nucleasa, que puede ser mediada por el complejo MRE^{261,262}, capaz de generar una cadena sencilla de ADN en dirección 3'; posteriormente esta cadena será rodeada por la proteína RPA y otras proteínas como BRCA1, BRCA2, RAD51, RAD52 y RAD54^{263,264}. El filamento núcleoproteico resultante de la formación de este complejo, invade la cadena complementaria de la cromátida hermana formando un heterodúplex que se resolverá mediante la acción complementaria y combinada de polimerasas, helicasas, topoisomerasas y ligasas^{265,266} (Figura 7).

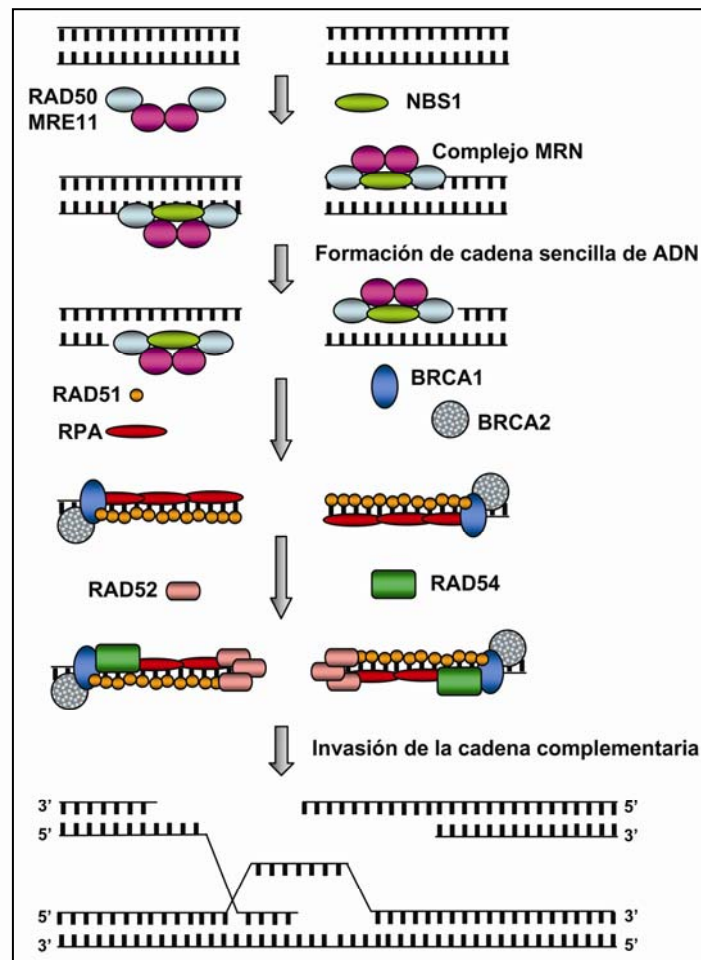


Figura 7. Representación esquemática de las diferentes etapas que ocurren durante la reparación de roturas de la doble cadena de ADN mediante recombinación homóloga.

Alteraciones (p.ej.: mutación) de alguno de los genes que codifican para cada una de las enzimas y proteínas involucradas en los mecanismos de reparación y recombinación de ADN, pueden originar reagrupamientos anómalos de material genético, alteraciones de la macroestructura de los cromosomas y de la expresión de algunos genes, constituyendo uno de los mecanismos que podrían estar en el origen de algunas alteraciones genéticas involucradas en el proceso de la transformación neoplásica²⁶⁷. Algunas de estas anomalías se traducen en cambios cariotípicos en forma de inversiones y translocaciones cromosómicas, en las que puede además perderse parte del material genético de los cromosomas implicados. En la actualidad, los mecanismos moleculares de los reordenamientos cromosómicos –p.ej. translocaciones– que ocurren en células neoplásicas son en general poco conocidos, aunque se cree podrían producirse en células que entran en mitosis sin haber reparado adecuadamente roturas en la doble hélice de su ADN^{268,269}. En este sentido, los genes involucrados en el control y reparación del daño en el ADN, son genes candidatos a participar en la génesis de estas translocaciones, siempre que su función se encuentre alterada²⁵⁸. Dado que estos reordenamientos cromosómicos con frecuencia se asocian también a pérdidas más o menos extensas de material genético, los defectos en los mecanismos de recombinación del ADN podrían estar también en el origen de deleciones cromosómicas²⁷⁰.

3.4.1.3.- Alteraciones a nivel de los telómeros.

Los telómeros son complejos formados por secuencias cortas y repetitivas de ADN y proteínas localizados en los extremos de los cromosomas, esenciales para mantener la integridad de los mismos a través de la actividad telomerasa²⁷¹. Desde el

punto de vista funcional, los telómeros protegen los extremos del cromosoma de ser reconocidos incorrectamente como roturas de la doble hélice del ADN, evitando así que se inicie una respuesta inadecuada a daño en el ADN. Además, protegen también los extremos cromosómicos de una posible degradación enzimática y previenen fusiones terminales entre cromosomas²⁷². Aunque los telómeros por sí solos no intervienen en la segregación de los cromosomas durante la mitosis, se requiere de su integridad para que ésta se desarrolle correctamente. En este sentido, Kirk et al²⁷³ demostraron por primera vez, que un defecto en los telómeros podía ocasionar alteraciones en la segregación de los cromosomas durante la mitosis. Así, estos autores demostraron que la mutación de la secuencia de ADN de los telómeros, debido a alteraciones de la actividad telomerasa, originaba un retraso/bloqueo en la anafase; de este modo, aunque las cromátidas hermanas empiezan a separarse, no son capaces de segregarse correctamente a los polos opuestos de las células hijas; ello facilita la generación de reasociaciones genómicas que pueden afectar a vías relevantes de señalización celular y permitir la acumulación sucesiva de cambios genéticos que pueden conducir a la transformación neoplásica y/o la progresión tumoral²⁷⁴.

Desde el punto de vista molecular, hoy se conoce que la pérdida gradual de la longitud de los telómeros en células tumorales puede resultar de una expresión reducida/alterada de la actividad telomerasa²⁷⁵, constituyendo éste uno de los mecanismos implicados en la generación de inestabilidad cromosómica y progresión genética de la célula tumoral²⁵⁸. Entre las proteínas implicadas en la regulación del mantenimiento de la longitud de los telómeros, merece destacar las proteínas TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y Rap1 que forman el complejo denominado telosoma²⁷⁶. TRF1²⁷⁷ y TRF2²⁷⁸ se unen a regiones de la doble cadena de ADN de los telómeros; a su vez, TRF1 forma un complejo con las proteínas TIN2 y POT1²⁷⁷; esta última

proteína es reclutada a los telómeros por acción de TPP1²⁷⁹. Este complejo TRF1/TIN2/POT1 regula la homeostasis de los telómeros²⁷⁷. A su vez, Rap1 es introducida en los telómeros por medio de TRF2, regulando negativamente la longitud de los mismos *in vivo*²⁸⁰ (Figura 8).

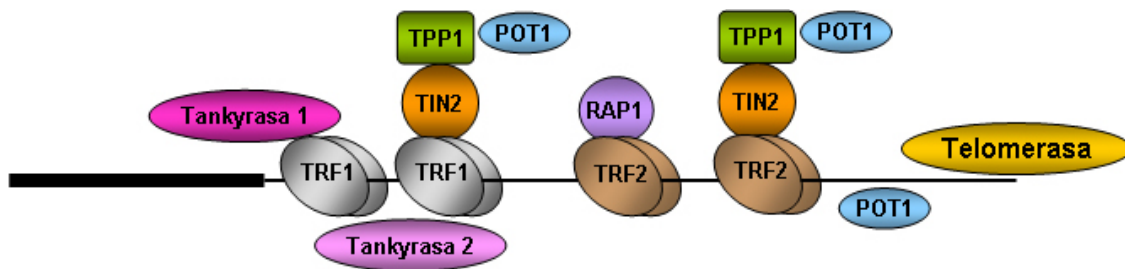


Figura 8. Esquema representativo de las proteínas y complejos multiproteicos implicados en la regulación y el mantenimiento de la longitud de los telómeros.

Otras proteínas que participan en la reparación de daño en el ADN y que pueden localizarse también en los extremos de los telómeros, son: 1) el complejo DNA-PK (Ku70/ Ku86/ DNA-PKcs); 2) el complejo MRN (MRE11/ RAD50/ NBS1), y; 3) las proteínas PARP1, PARP2, Tankyrasa 1, Tankyrasa 2, ATM, ERCC1/ XPF, RAD51D, WRN y BLM²⁸¹. En la actualidad se barajan varias hipótesis acerca de los posibles mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de la longitud de los telómeros, y por tanto, de la estabilidad cromosómica y el potencial proliferativo de la célula. Uno de estos mecanismos implica a la proteína tankyrasa 1, la cual es un regulador positivo del mantenimiento de la longitud de los telómeros²⁸². Así, se ha observado que una sobreexpresión de esta proteína en células tumorales humanas libera a la proteína TRF1 de los telómeros permitiendo el acceso de la telomerasa, y por tanto, la elongación de los mismos²⁸³. Después de que la proteína TRF1 se haya liberado del

ADN telomérico, es degradada mediante proteólisis mediada por ubiquitina, lo que impide que puedan volver a unirse a los telómeros²⁸³. Otra hipótesis que se baraja respecto al mantenimiento de la longitud de los telómeros es que ante el acortamiento crítico de los mismos, el cromosoma podría ser incapaz de reclutar un número suficiente de proteínas teloméricas encargadas de la formación del complejo protector en el extremo del ADN telomérico, con lo que ese extremo se asemejaría a una rotura en la doble hélice de ADN²⁸⁴. Por otro lado, la disminución o ausencia de secuencias teloméricas repetitivas suficientes para la formación de un telómero funcional, o bien el aumento en la concentración de proteínas teloméricas debido a la falta de lugares de unión para las mismas, podría generar señales que lleven a la senescencia celular²⁸⁴.

Diferentes estudios han señalado que las células deficientes en tankyrasa 1 entran normalmente en mitosis, sus cromosomas se alinean en la placa mitótica durante la metafase, pero son incapaces de continuar con la anafase al no dissociarse las cromátidas a nivel de los telómeros²⁸⁵. Recientemente, se ha demostrado una asociación entre el complejo de la cohesina y la cromatina telomérica a través de las proteínas TRF1 y TIN2²⁸⁶. La depleción de estos componentes suprimiría el requerimiento de tankyrasa 1 para la correcta progresión de la mitosis²⁸⁶.

3.4.2.- Ontogenia de las pérdidas del cromosoma 14 en meningiomas.

La pérdida total de un cromosoma 14 –monosomía 14– es una alteración genética característica de los meningiomas. Sin embargo, en la actualidad seguimos sin conocer con precisión el mecanismo (o mecanismos) implicados en esta pérdida cromosómica. En términos generales, Sawyer et al¹¹⁸ definen dos mecanismos principales involucrados en la generación de inestabilidad cromosómica recurrente, asociada a progresión clonal

y pérdida de material cromosómico, en meningiomas: 1) las asociaciones teloméricas, y; 2) las translocaciones cromosómicas en las que se ven involucradas regiones extensas (brazos enteros) de uno o más cromosomas. La inestabilidad genética reflejada en forma de asociaciones teloméricas, constituiría un evento relativamente frecuente en meningiomas, sin que se conozca con precisión los mecanismos implicados en la génesis de esta aberración¹¹⁸. Desde el punto de vista práctico, en los meningiomas estas alteraciones se traducirían en fusiones dicéntricas, pseudodicéntricas, multicéntricas y teloméricas^{69,73,126,129,207,209,287,288}.

El mecanismo mediante el cual las asociaciones teloméricas conducirían a deleciones y reasociaciones estructurales derivaría a su vez, de la ocurrencia de ciclos de “rotura-fusión-puente” entre los centrómeros de cromosomas dicéntricos²⁸⁹. Así, durante la anafase, los cromosomas aberrantes formarían puentes que acaban rompiéndose; los extremos rotos se reunirían y reorganizarían, originando nuevas variantes de estos cromosomas anómalos, que a su vez resultarían en deleciones no balanceadas, más o menos extensas, de diferentes regiones cromosómicas. De esta manera, los tumores que muestran este tipo de alteraciones cromosómicas presentan elevada inestabilidad mitótica, lo que conlleva una mayor heterogeneidad genética/cromosómica²⁹⁰⁻²⁹². En los meningiomas, las asociaciones teloméricas se ha sugerido podrían estar implicadas en las pérdidas de los cromosomas 22 y 1p²³⁰; sin embargo, se desconoce si este mecanismo es también el responsable de las pérdidas del cromosoma 14 en estos tumores.

El segundo mecanismo de inestabilidad genética asociado a pérdida cromosómica en meningiomas involucraría translocaciones cromosómicas cuyos puntos de rotura ocurren en regiones pericentroméricas e implican a regiones extensas de un cromosoma (p.ej. brazos cromosómicos completos). Este tipo de translocación no balanceada

puede ocasionar también la pérdida completa de uno o de los dos brazos completos de un cromosoma, aunque no se conocen con precisión los mecanismos moleculares implicados en las mismas¹¹⁸. En términos generales, estas translocaciones implican una división alterada del centrómero, la pérdida de un brazo cromosómico y el movimiento del brazo residual a un cromosoma receptor. En este sentido, hoy se cree que la presencia de del(1p), asociada a la rotura del cromosoma 1 a nivel de la banda centromérica 1q10, podría tener origen en un defecto centromérico o pericentromérico del cromosoma 1¹¹⁸. Las translocaciones centrómero-centrómero de 1q resultan tanto en la pérdida de 1p, como de todo el brazo cromosómico perteneciente al cromosoma receptor¹¹⁸. En este sentido, merece destacar que se ha observado también una mayor frecuencia de translocaciones teloméricas de 1q a cromosomas no homólogos, sugiriendo que tanto las regiones centroméricas de este cromosoma, como las teloméricas, contienen secuencias que podrían ser más propensas a la recombinación²⁹³.

En conjunto, estos hallazgos indicarían que tanto la inestabilidad telomérica como la centromérica, podrían estar implicadas en la generación de heterogeneidad y la progresión genética de los meningiomas. De acuerdo con esta hipótesis, se ha constatado la ocurrencia de fusiones teloméricas en fases tempranas de la enfermedad, especialmente en meningiomas benignos²³⁰; además, se han observado asociaciones teloméricas entre el cromosoma 14 y otros cromosomas que suelen mostrar también deleciones/pérdidas de material genético como los cromosomas 1 y 22^{118,230}.

3.4.3. Impacto pronóstico de las alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas.

Actualmente, se considera que la transformación maligna y la progresión de los meningiomas estaría relacionada, desde el punto de vista genético, más que con alteraciones individuales, con el acúmulo secuencial de alteraciones genéticas concretas de las que merecen especial destaque la del(1p) y la monosomía 14/14q^{110,200}; ambas alteraciones están habitualmente asociadas a cariotipos complejos^{122,294}. Así, hoy se acepta que la pérdida de un cromosoma 14, asociada o no a del(1p), podría constituir un cambio relativamente temprano en la progresión de los meningiomas, detectándose incluso entre los pacientes con tumores histológicamente benignos^{108,110}. No obstante, la frecuencia de estas anomalías entre los meningiomas histológicamente más agresivos, es elevada y claramente superior a la detectada en tumores benignos. Así, Simon et al¹²⁴, empleando 14 marcadores de LOH para la región 14q12-14q32, demostraron que, mientras que más de la mitad de los meningiomas histológicamente malignos (grado II/III) presentaban deleciones de 14q, éstas estaban ausentes en los tumores histológicamente benignos (grado I) analizados. De acuerdo con estos hallazgos, Lindblom et al²⁹⁵ corroboraron también la existencia de pérdidas de material genético de la región 14q32.1-q32.2 en casi la tercera parte de los meningiomas anaplásicos. Aunque en ninguno de estos dos estudios se exploró el impacto pronóstico de las pérdidas de material genético del cromosoma 14q en la supervivencia de los pacientes, estos hallazgos sugieren la probable asociación de la del(14q) con un comportamiento más agresivo de la enfermedad y un peor pronóstico. Estudios posteriores han comprobado que, tanto en los meningiomas histológicamente benignos como en los anaplásicos, la pérdida de material genético del cromosoma 14q se asocia a una supervivencia global significativamente acortada, respecto a la de los demás pacientes con meningioma¹¹⁰. A pesar de la asociación encontrada en los meningiomas entre el grado histológico del tumor y una mayor frecuencia de del(14q), existen múltiples

referencias en la literatura acerca de la existencia también de pérdidas del cromosoma 14 en meningiomas benignos^{73,91,108,110,126}; así, su frecuencia oscila en los distintos subtipos histológicos entre una tercera parte de los meningiomas benignos, 40-57% de los tumores atípicos y 55-100% de los meningiomas anaplásicos^{108-110,122,124,131,241}. Además, la pérdida de un cromosoma 14 suele coexistir con del(1p), siendo pocos los casos de meningiomas benignos descritos en la literatura con del(14q)/monosomía 14 en ausencia de del(1p)^{91,110,122}; la mayoría de ellos correspondería además a tumores recurrentes^{110,198,200}.

La cooperación debida a la inactivación simultánea de distintos genes supresores de tumor localizados en los cromosomas 1p y 14, podría constituir un evento relevante en la patogénesis de los meningiomas, implicado en la transición de los meningiomas benignos a atípicos^{110,122} y asociado a peor pronóstico. De acuerdo con ello, Pfisterer et al²⁰¹ demostraron la existencia de una asociación significativa entre la del(1p) y la monosomía 14 en un pequeño grupo de meningiomas benignos; desde el punto de vista pronóstico, estos marcadores citogenéticos mostraron un valor predictivo de recidiva, independiente del grado de resección de Simpson. Por otra parte, estos mismos autores²⁰¹ sugieren la existencia de una distribución espacial variable de las células portadoras de del(1p), de pérdidas del cromosoma 14 y de anomalías del cromosoma 22; así, mientras que en los meningiomas histológicamente más avanzados estas alteraciones cromosómicas se distribuyen a lo largo de todo el tejido tumoral, en los tumores benignos/grado I se localizarían de forma preferencial en algunas regiones del tejido tumoral, mostrando una distribución heterogénea; además, refieren también una disminución de la heterogeneidad genética del tumor, con un patrón de localización más difuso de las células portadoras de estas alteraciones cromosómicas, en aquellos meningiomas que recidivan.

En términos generales, en la actualidad se considera que la del(14q)/monosomía 14 podría constituir uno de los factores pronósticos más relevantes a la hora de predecir recurrencia tanto cuando se considera el conjunto de los meningiomas, como cuando se tienen en cuenta exclusivamente los meningiomas benignos/grado I. En este sentido, se ha comprobado que los meningiomas histopatológicamente benignos que muestran recurrencia, presentan con mayor frecuencia monosomía 14/del(14q), respecto a los tumores de grado I que no recidivan¹¹⁰. Asimismo, se ha sugerido que la frecuencia de pérdidas del cromosoma 14 entre los meningiomas histológicamente benignos recurrentes, podría ser similar a la observada entre los meningiomas atípicos (50% vs. 57%, respectivamente)¹¹⁰. Estos hallazgos sugieren que, aunque la aparición de del(14q)/monosomía 14 podría preceder a la evidencia histológica de progresión, esta alteración conferiría un fenotipo biológico más agresivo e independiente del grado tumoral. No obstante, cabe señalar que el valor predictivo de las pérdidas de material genético del cromosoma 14 estaría, en principio, restringido a meningiomas de adultos; ello es debido a que entre los meningiomas pediátricos²⁴⁰, los tumores histológicamente benignos presentan una frecuencia relativamente elevada de del(14q)/monosomía 14 junto con del(1p) sin que estas alteraciones muestren una asociación significativa con la recidiva²⁴⁰.

Pese a los hallazgos anteriores, en la actualidad siguen siendo escasos los estudios en los que se analiza el posible valor pronóstico independiente de la monosomía 14/del(14q) respecto a otras variables clínico-biológicas y citogenéticas, incluso en adultos. En este sentido, Cai et al¹¹⁰ encontraron la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre el grado histológico del tumor y la presencia de monosomía 14 y del(1p); según estos autores, los casos que aún teniendo el mismo subtipo histológico, presentaban alteración de al menos uno de estos dos

cromosomas, mostraban una supervivencia global significativamente inferior. Especial mención merece el hecho de que estos autores no hayan podido encontrar diferencias significativas en la frecuencia de deleciones de los cromosomas 1p y 14q, respecto a la tasa proliferativa y a la capacidad invasiva de tejidos circundantes (p.ej. el cerebro), sugiriendo además que el principal determinante genético responsable de la tasa de proliferación celular y la capacidad invasiva de estos tumores a través de la piamadre, no se encontraría codificado por un gen supresor de tumor localizado en estos cromosomas. De forma similar, Ketter et al³⁴ han demostrado que las anomalías de los cromosomas 14 y 1p se asocian con una mayor frecuencia de recaídas. Más recientemente, nuestro grupo¹⁹⁸ ha podido corroborar el valor pronóstico de la monosomía 14/14q; además, hemos demostrado que esta alteración genética, la edad del paciente en el momento del diagnóstico y el grado histológico del tumor, constituyen la mejor combinación de variables independientes para predecir la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con meningiomas. Con la combinación de estos tres parámetros, en este último estudio¹⁹⁸ se propuso un sistema de puntuación simple y eficaz, que permitiría clasificar al diagnóstico a pacientes adultos con meningioma en tres subgrupos con un riesgo de recaída a los 5 y 10 años significativamente diferente.

Aunque en la actualidad siguen sin conocerse con precisión los mecanismos a través de los cuales la presencia de monosomía 14/14q se asociaría a una mayor frecuencia de recidivas y un peor pronóstico, éstos podrían deberse a un comportamiento biológico diferente de estos tumores, asociado a un mayor grado de infiltración del tejido peritumoral, que facilitaría la permanencia de enfermedad residual responsable de la recidiva del tumor, de forma independiente del grado histológico, del tamaño del meningioma y de otras características del tumor. Pese a todo lo anterior, en

los estudios en los que se ha explorado el impacto pronóstico de las alteraciones del cromosoma 14, se han incluido una proporción significativa de recidivas a largo plazo, que han ocurrido incluso después de más de 20 años de la cirugía, sin que se haya explorado su valor predictivo a corto plazo (en los primeros años tras la cirugía).

4.- FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS MENINGIOMAS.

La clasificación de los meningiomas propuesta por la OMS en el año 2000¹² y revisada en el año 2007¹¹, representó un avance significativo respecto a clasificaciones anteriores, a la hora de predecir el comportamiento clínico y evolutivo de los meningiomas. Sin embargo, el esquema de clasificación propuesto sigue incluyendo un importante componente de subjetividad sin llegar a resolver de forma clara la estratificación pronóstica de los tumores benignos/grado I, entre las que se incluyen, en términos absolutos, la mayoría de las recidivas²⁹⁶⁻²⁹⁸. Por todo ello, en las últimas décadas se ha buscado con ahínco identificar características clínicas, biológicas, genéticas y moleculares que permitan reconocer, ya en el momento del diagnóstico, qué pacientes presentan un elevado riesgo de recaída, y diferenciarlos de los que se curan con la cirugía, complementando la estratificación pronóstica basada en criterios histopatológicos.

En la actualidad sabemos que la recidiva, que ocurre incluso en tumores benignos en los que se ha realizado una exéresis quirúrgica completa del tumor y su base de implantación, constituye la principal causa de muerte entre los pacientes con meningioma¹⁴⁻¹⁶, seguida de las metástasis¹², que se observan de forma excepcional¹⁴⁻¹⁷. En conjunto, se considera que alrededor de una cuarta parte de los pacientes con meningioma en los que se ha realizado una cirugía curativa desde el punto de vista

microscópico, recae a los 10 años de la cirugía del tumor primitivo^{13-15,54,297,299}, incrementándose la frecuencia de recurrencia a los 5 y 10 años al 50% y 100% de los pacientes, en aquellos casos en los que la cirugía ha sido parcial o subtotal.^{13-15,54,297}.

De todas las características clínicas e histopatológicas analizadas, la edad^{16,299}, el tamaño del tumor^{16,198}, el subtipo histológico^{15,27,34,35,299,300} y el grado de resección tumoral^{15,16,301,302}, constituyen los factores pronósticos de mayor valor predictivo en relación con la supervivencia libre de recaída de los meningiomas. Además, existen otras características clínicas que influyen en la recurrencia de estos pacientes como son la localización tumoral^{13,15,16,34,59,198,199}, el género^{5,15,16,37,72,83}, la expresión de receptores de progesterona^{52,303-305} y la tasa proliferativa del tumor^{16,198,302,306-308}. Pese a estas asociaciones pronósticas, en la actualidad seguimos sin disponer de un sistema de estratificación pronóstica en el que se combinen características clínicas, biológicas y genéticas de estos pacientes, y que permita predecir, a corto *versus* largo plazo, la evolución de los pacientes con meningioma, especialmente entre aquellos que muestran un comportamiento histológico benigno. En este sentido, merece destacar los esfuerzos realizados recientemente por diferentes grupos, incluyendo el nuestro, para establecer sistemas de puntuación pronóstica basados en la combinación de la información genética y otras características clínicas y/o histológicas del tumor^{137,198}. Aún así, el grado de aceptación de estos sistemas de puntuación ha sido limitado, probablemente debido a la combinación de diversos factores, de los que cabe resaltar la escasa difusión de los estudios genéticos en meningiomas, la carencia de sistemas predictivos a corto *vs* largo plazo, y la necesidad de confirmar los hallazgos de estos estudios en series más amplias, a nivel multicéntrico. A continuación, en este apartado, revisaremos los hallazgos más relevantes referidos en la literatura en relación con aquellas características clínicas y biológicas que se ha referido presentan un impacto en el pronóstico de los

meningiomas. Obviaremos la referencia al valor pronóstico de las características citogenéticas del tumor, dado que éste se ha revisado anteriormente en esta introducción (secciones 3.3 y 3.4.3).

4.1.- IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL TUMOR PRIMITIVO.

Hoy se reconoce el impacto pronóstico de diferentes características clínicas de los meningiomas, a la hora de predecir su potencial de recrecimiento y/o recurrencia. Dentro de ellas, aquellas que se asocian con una mayor probabilidad de recidiva incluyen el tamaño^{39,309-311} y la localización tumoral^{13,15,16,34,198}, la edad^{16,198,299,312} y el género^{5,15,16,37,72,83}.

Los meningiomas muestran un tamaño muy variable que oscila desde <1cm a tumores de gran tamaño (>5cm). En general, un mayor tamaño tumoral se ha relacionado con una mayor tendencia a la recidiva^{39,309-311} y con un mayor grado de invasión tumoral con adherencia a la membrana aracnoidea y al tejido cerebral adyacente^{39,309,310}. Como ya sugirió Cushing en 1922³¹, hoy se reconoce que la frecuencia y comportamiento de los meningiomas varían también de acuerdo a la localización del tumor. Así, los meningiomas que se encuentran en localizaciones técnicamente más complicadas a la hora de lograr una resección completa del mismo, se asocian con una cirugía más conservadora –su extirpación podría dañar estructuras cerebrales vasculares o neurales importantes–, lo que podría contribuir a explicar su comportamiento clínico más agresivo⁴⁰. Dentro de estas localizaciones se incluirían la base del cráneo, los ventrículos o la pared del seno cavernoso^{16,59,198,313-315}. Según algunos autores, en estos casos, la probabilidad de que ocurra un recrecimiento del

tumor aumenta hasta el 40%, mientras que en los meningiomas con topografías más favorables (p.ej. los tumores localizados en la convexidad, en la hoz o en la médula espinal), la tasa de recurrencia sería significativamente inferior^{316,317}.

Mientras que para algunos autores, la edad a la que se diagnostica el meningioma no es indicativa de un comportamiento más agresivo^{13,15,318,319}, otros sí han encontrado una asociación significativa entre la edad y la evolución clínica de los pacientes, reflejada en una supervivencia libre de recurrencia significativamente más corta entre individuos más jóvenes^{16,198,299,312}. Especialmente mal pronóstico muestran los varones con una edad al diagnóstico inferior a 40 años, y que son portadores de tumores histológicamente malignos o de meningiomas benignos localizados en la base del cráneo⁵⁴. En este sentido, merece destacar también que, aunque los meningiomas se manifiestan con un predominio claro ($>2/1$) de mujeres sobre los varones, especialmente en el caso de los tumores espinales y en los subtipos histológicamente benignos^{1-6,320}, el sexo masculino se ha asociado a peor pronóstico^{16,54,321}. Esto podría ser debido, entre otros factores, a que la relación mujer/hombre se iguala e incluso se invierte, en meningiomas atípicos y anaplásicos^{15,25,59,199,300}. De acuerdo con estos hallazgos, se ha sugerido que la ausencia de predominio femenino en los meningiomas histológicamente malignos, podría deberse a que las diferencias hormonales, aparentemente importantes en la génesis de los meningiomas, dejarían de tener un papel activo en los tumores malignos³⁰⁰.

Durante décadas, estas diferencias en cuanto a la frecuencia y el comportamiento clínico de los meningiomas en hombres y mujeres, se han relacionado con factores hormonales^{8,52,322-325}; así, se ha descrito un crecimiento más rápido de los meningiomas y una exacerbación de los síntomas, durante el embarazo³²⁶⁻³²⁸ y en la fase lútea del ciclo menstrual³²⁹; además, se ha referido una posible asociación entre el

desarrollo de meningiomas y cáncer de mama³³⁰⁻³³². Por otro lado, aproximadamente 70% de los meningiomas expresan receptores de progesterona, independientemente del sexo del paciente³⁰³, habiéndose relacionado la expresión de receptores de progesterona con una evolución más favorable de la enfermedad^{48,49,52,303,322,333,334}, reflejada en una menor tasa proliferativa y probabilidad de recidiva^{52,303-305}. No obstante, un análisis detallado de estos trabajos y sus hallazgos, muestra que en la actualidad, tanto las causas concretas como los mecanismos específicos que conducen a un predominio femenino de los meningiomas, siguen siendo desconocidos, pudiendo ser limitado el papel que juegan las hormonas esteroideas en la ontogenia de los meningiomas³³⁵. De forma similar, el impacto pronóstico del género sigue sin demostrarse de forma fehaciente; junto a los estudios en los que se ha referido un peor pronóstico en varones^{15,299}, existen numerosos trabajos en los que esta asociación pronóstica no ha podido confirmarse^{15,36,39,313,318}. En este sentido, recientemente se ha demostrado una mayor frecuencia de cariotipos complejos asociados a progresión tumoral y alteraciones de los cromosomas 1p y 14 entre los varones, mientras que los meningiomas diagnosticados en mujeres presentan alteraciones citogenéticas que incluyen una menor frecuencia de monosomía 14 y del(1p) y una mayor proporción de casos con aberraciones numéricas de los cromosomas 22 y X^{65,67,91,113,122,193,198,199}, lo que podría contribuir a explicar el peor pronóstico de los meningiomas en varones, referido en la literatura por algunos autores.

4.2.- IMPACTO PRONÓSTICO DE LAS CARACTERÍSTICAS NEURORADIOLÓGICAS DEL TUMOR PRIMITIVO.

La introducción de nuevas técnicas de diagnóstico por imagen como la TAC, y sobre todo la RMN, ha contribuido de forma notable a una mayor precisión y sensibilidad diagnósticas y a un seguimiento postoperatorio más estrecho de los pacientes. Además, ha facilitado también una mejor caracterización de forma previa a la cirugía, tanto del tumor primitivo como de las recidivas, al permitir definir con precisión, no sólo el tamaño, forma, densidad, puntos de calcificación, grado de extensión del edema y límites entre los distintos tejidos, sino también la extensión de la afectación dural y la posible invasión de estructuras vecinas¹⁰. Desde el punto de vista pronóstico, los meningiomas con una morfología plana, adheridos longitudinalmente a la duramadre, y los de aspecto lobulado y sin calcificaciones, muestran tasas de recidiva significativamente superiores a las de los tumores con morfología más esférica y calcificaciones^{39,336}. Estos últimos suelen presentar además, menor tamaño y tasa de crecimiento³³⁷⁻³³⁹. Aunque radiológicamente los meningiomas atípicos y anaplásicos con frecuencia presentan apariencia heterogénea, una densidad de contraste homogénea, una superficie cerebral nodular o irregular, un crecimiento ilimitado por el extremo de la lesión, destrucción ósea, ausencia de calcificación y/o presencia de un marcado edema^{300,340,341}, ninguna de estas características es específica de estos tumores pudiendo también presentarse en meningiomas histológicamente benignos³⁴².

Desde el punto de vista pronóstico, algunos autores han demostrado la existencia de una asociación significativa entre la presencia de edema peritumoral –y su grado de extensión– y el comportamiento agresivo/recurrencia de la enfermedad^{39,315}. En este sentido, cabe señalar que el edema peritumoral es habitualmente independiente del tamaño del tumor, y puede aparecer también en menor frecuencia, en los subtipos de meningiomas histológicamente benignos³⁴². Varios estudios sugieren que el edema asociado a los meningiomas es debido a la existencia en el tumor de un alto índice

proliferativo, con frecuencia asociado a la producción de factores angiogénicos; estos contribuirían por un lado, al comportamiento más agresivo de la enfermedad, y por otra parte, a una mayor frecuencia de recurrencias^{39,343,344}. En este sentido, hoy se conoce que al igual que ocurre en otros tumores, los meningiomas inducen angiogénesis a través de mecanismos paracrinos que involucran entre otras moléculas, el receptor del factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGFR). Así, la expresión de VEGFR en meningiomas se correlaciona de forma significativa con el grado de vascularización del tumor y en general, sus niveles aumentan con el grado histológico^{344,345} y entre aquellos pacientes que muestran recidiva^{307,346,347}.

4.3.- IMPACTO PRONÓSTICO DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.

En la actualidad, el tratamiento curativo de los meningiomas sigue fundamentándose en la exéresis quirúrgica completa del tumor, que se alcanza en la mayoría de los casos, al tratarse de lesiones bien delimitadas⁴⁰. Sin embargo, en aquellos meningiomas que se sitúan en localizaciones de difícil acceso, recubriendo estructuras vasculares y/o neurales, o que invaden los tejidos adyacentes, con frecuencia resulta imposible la resección total del tumor^{40,340,348-351}; en este caso, pueden plantearse opciones terapéuticas complementarias como la administración de radioterapia convencional o la radiocirugía^{13,14,350,352-355} y de forma puntual, protocolos de tratamiento quimioterápico^{356,357} y hormonal³⁵⁸⁻³⁶⁰ que hasta ahora han demostrado una eficacia muy limitada. Como cabría esperar, en este grupo de pacientes, la resección quirúrgica incompleta o subtotal del tumor y su base de implantación en la duramadre, representan un factor pronóstico adverso, asociándose con una elevada frecuencia de recrecimiento y recidiva clínica del tumor^{14,40,298}. Desde el punto de vista práctico, en la

actualidad siguen empleándose los criterios propuestos por Simpson en 1957⁴⁰ para la evaluación del grado de resección tumoral (Tabla 3). Estos criterios se fundamentan en que, cuando se realiza la exéresis quirúrgica de un meningioma, ésta persigue, no sólo extirpar la masa tumoral en su totalidad, sino que, eliminar además la duramadre donde se implanta el tumor, y un borde mínimo de uno^{315,361} o dos cm³⁶² más allá de los límites de implantación tumoral, hasta donde se extenderían los nidos de células neoplásicas^{315,361,362}.

Tabla 3. Criterios empleados para la definición de los grados de resección tumoral de Simpson⁴⁰

Grado I	Resección macroscópicamente completa del tumor, de su implantación dural y del hueso afectado adyacente.
Grado II	Resección macroscópicamente completa del tumor y coagulación de su base de implantación.
Grado III	Resección macroscópicamente completa del tumor intradural sin resección o coagulación de su base de implantación.
Grado IV	Resección subtotal del tumor.
Grado V	Descompresión o biopsia del tumor.

Aunque como hemos comentado anteriormente, existe una relación inversa entre la escala de Simpson y la evolución de los pacientes con meningioma tras la cirugía^{13,15,16,301,363}, ésta dista de ser absoluta. Así, aunque en la mayoría de los meningiomas, tras la exéresis quirúrgica completa del tumor y su base de implantación, se alcanza la curación y la enfermedad evoluciona de forma benigna sin otras

complicaciones que las derivadas de la cirugía, y con una esperanza de vida similar a la de la población general de la misma edad¹³, la resección completa del tumor no garantiza que no se produzca recidiva; así, se han referido tasas de recidiva a los 5 y 10 años que oscilan entre el 7-18%^{13-15,54,297} y 12-35%^{13-15,54,297,299}, respectivamente, en aquellos meningiomas en los que se ha realizado una exéresis total del tumor. Ante estos hallazgos, es importante insistir en la necesidad de diferenciar entre una verdadera recidiva y el recrecimiento tumoral, a la hora de evaluar la supervivencia libre de recidiva de pacientes con meningioma³²¹. Mientras que la recidiva implicaría la reaparición del meningioma después de una aparente desaparición macroscópica del mismo tras la exéresis quirúrgica, el recrecimiento reflejaría el desarrollo progresivo de un tumor cuya resección ha sido parcial o subtotal. En este último supuesto, las tasas de recrecimiento tumoral se incrementan hasta el 25-52% a los 5 años^{13-15,54,297}, alcanzando incluso el 100% de los pacientes cuando el seguimiento es ≥ 10 años¹⁴ (Tabla 4).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se entiende que la efectividad de la exéresis tumoral, y por tanto la probabilidad de recidiva y/o recrecimiento, pueda depender en cierta medida de la localización del tumor^{13,15,16,34,198,313-315,361,363-365}, si bien existe cierta controversia a este respecto^{36,318}. Finalmente, merece destacar que cuando comparamos las tasas de morbilidad de las intervenciones quirúrgicas por recidivas con las de meningiomas primarios, las primeras se asocian a un mayor número de complicaciones clínicas y una supervivencia global significativamente más corta, lo que podría estar relacionado según algunos autores, con un mayor grado de agresividad histológica, asociado a una tasa más elevada de infiltración de los tejidos circundantes, en el caso de los tumores recurrentes^{38,365}.

Tabla 4. Frecuencia de recidiva y/o recrescimiento tumoral en función del grado de resección quirúrgica referido en algunas de las series más relevantes de la literatura.

SERIE (Nº de casos)	% de recidiva a los 5 años	% de recidiva a los 10 años	% de recidiva a los 15 años	% global de recidiva
Adegbite et al (n= 114)²⁹⁷				
Grado I (n=33; 29%)	14%	12%		
Grado II (n= 55; 48%)	18%	28%		
Grado III (n= 7; 6%)				
Grado IV (n= 18; 16%)	52%	68%		
Grado V (n= 1; 1%)				
Mirinanoff et al (n= 225)¹³				
Resección total (n= 145; 64%)	7%	20%	32%	
Resección subtotal (n= 80; 36%)	47%	55%	91%	
Mathiesen et al (n= 313)¹⁴				
G I (n= 53; 17%)	3%		7-10%	
G II (n= 135; 43%)	4%		11-15%	
G III (n= 56; 18%)	25%		37-43%	
G IV (n= 55; 18%)	45%		81-100%	
G V (n= 14; 4%)	36%		63-100%	
Perry et al (581)⁵⁴				
Resección total (n=463; 80%)	12%	25%		
Resección subtotal (n= 118; 20%)	39%	61%		
Ayerbe et al (n= 285)¹⁵				
G I (n= 108; 38%)	8%	31%	31%	
G II (n= 134; 47%)	15%	35%	57%	
G III-IV (n= 43; 15%)	30%	62%	79%	
Ildan et al (n= 137)³⁹				
G I (n= 121; 88%)				7%
G II (n= 11; 8%)				36%
G III (n= 5; 4%)				80%

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los meningiomas son tumores primarios del SNC de naturaleza ectodérmica, que se originan en las células meningoteliales de la aracnoides. Son tumores con un marcado predominio en mujeres, generalmente de crecimiento lento e histopatológicamente benignos; sin embargo, en un porcentaje significativo de casos se observan recidivas asociadas a veces, a un comportamiento clínico-biológico agresivo, incluso después de haberse realizado una exéresis quirúrgica completa del tumor, lo que influye de forma decisiva en el pronóstico de la enfermedad. Pese a la asociación estrecha existente entre las características histopatológicas de los meningiomas y el pronóstico de la enfermedad, hoy se reconoce que incluso dentro del mismo subtipo histológico, los meningiomas muestran un comportamiento clínico y evolutivo heterogéneo, independientemente de que se haya realizado una resección completa del tumor, correspondiendo además (en números absolutos) la mayor parte de las recidivas a tumores histológicamente benignos. Por todo ello, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de factores pronósticos que complementen la información pronóstica del grado histopatológico. A pesar de que se han identificado algunos factores pronósticos, la naturaleza exacta de las recidivas de los meningiomas sigue siendo desconocida. Así, la reaparición del tumor después de una exéresis total del mismo bajo control radiológico, podría ser debida a: 1) la persistencia de células tumorales con capacidad clonogénica por la dispersión de células tumorales durante la propia cirugía; 2) a microinvasión de los vasos y tejidos circundantes, y/o; 3) a una resección microscópica incompleta del tumor. Alternativamente, la recidiva podría deberse al desarrollo de un nuevo tumor independiente del meningioma inicial, sobre todo cuando ésta ocurre tras largos periodos –décadas– de remisión.

En los últimos años se ha avanzado de forma notable en el conocimiento de las anomalías cromosómicas más frecuentes de los meningiomas. Así, los estudios

centrados en identificar los cambios genéticos asociados con la formación y la progresión maligna de los meningiomas han demostrado la existencia de un importante número de alteraciones cromosómicas. Probablemente estas alteraciones son debidas a la interacción de la célula tumoral con diferentes factores genéticos y ambientales que estarían en el origen de la fragilidad e inestabilidad cromosómica característica de las mismas, si bien, siguen sin conocerse los mecanismos íntimos implicados en estos procesos. Como resultado de los estudios citogenéticos y moleculares realizados, hoy sabemos que los meningiomas son tumores genéticamente heterogéneos, en los que la presencia de alteraciones numéricas de cromosomas representa un hallazgo relativamente frecuente. De todas las alteraciones cromosómicas descritas en los meningiomas, la monosomía 22/22q⁻ es la más habitual, estando implicada en el proceso de transformación neoplásica. En contraposición, otras alteraciones genéticas características de los meningiomas, como la delección del cromosoma 1p y la monosomía 14 se han relacionado, más que con el origen del tumor, con su progresión. Pese a estos hallazgos, hasta la fecha no se ha demostrado de forma sistemática la relación existente entre los patrones de alteraciones genéticas y de evolución clonal observadas en el tumor primitivo al diagnóstico y las subsiguientes recidivas, lo que serviría para establecer de forma más precisa la relación genética existente entre ambos.

Asimismo, aunque la presencia de delecciones de los cromosomas 1 y 14 se ha asociado con un predominio en varones, subtipos histológicos agresivos y un peor pronóstico, a diferencia de lo que ocurre con la monosomía 22/22q⁻, en la actualidad seguimos sin disponer de estudios en los que se identifiquen de forma sistemática las causas y mecanismos genéticos que podrían conducir al predominio femenino de los meningiomas y a la relación observada entre el género y algunas de estas alteraciones cromosómicas. De forma similar, a pesar de la estrecha asociación encontrada entre las

pérdidas del cromosoma 14 y el pronóstico de la enfermedad, son escasos los estudios en los que se ha tratado de definir las alteraciones concretas de este cromosoma que confieren un pronóstico desfavorable. Esto es debido, al menos en parte, a limitaciones técnicas, ya que hasta hace relativamente pocos años, no disponíamos de técnicas de alta resolución para el análisis masivo de anomalías genéticas y genómicas o la detección de diferentes clones de células tumorales a nivel intratumoral. En la actualidad, este panorama se ha modificado y disponemos de una amplia batería de técnicas que permiten alcanzar estos objetivos, entre las que se incluyen los “microarrays” de expresión, los “arrays” de CGH o la iFISH multicolor, respectivamente.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética de los meningiomas recurrentes con el fin de establecer la posible relación existente entre el tumor primario y la recidiva, y avanzar en el conocimiento de los posibles mecanismos genéticos/genómicos implicados en el predominio femenino de estos tumores y la asociación de las alteraciones del cromosoma 14 con el comportamiento clínico-biológico y evolutivo de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1.- Determinar la relación genética existente en pacientes con meningiomas recurrentes, entre el tumor primario y la recidiva, y establecer el impacto de las alteraciones cromosómicas detectadas en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo del tumor.

2.- Analizar comparativamente los patrones de alteraciones cromosómicas y los perfiles de expresión génica en meningiomas de varones y mujeres, y determinar su posible implicación en el predominio femenino de estos tumores.

3.- Caracterizar de forma detallada las anomalías del cromosoma 14 en meningiomas y determinar su posible asociación con las características clínicas y el comportamiento evolutivo del tumor.

III. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS

En esta sección de la memoria se describen los pacientes, los materiales y los métodos empleados, así como los resultados obtenidos en relación a cada uno de los objetivos planteados, mediante la inclusión de los artículos publicados como consecuencia del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido de un breve resumen en castellano que facilita una rápida revisión de la información contenida en los mismos. Los artículos incluidos en este apartado son:

- En relación con el primer objetivo, centrado en analizar la relación citogenética existente entre el tumor primario y la recidiva, y establecer el impacto de las alteraciones cromosómicas detectadas en el comportamiento clínico, biológico y evolutivo del tumor:

3.1.- The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse.

AB Espinosa, MD Tabernero, A Maillo, JM Sayagués, J Ciudad, M Merino, MC Algueró, AM Lubombo, P Sousa, A Santos-Briz, A Orfao. *Clinical Cancer Research*, 2006; 12: 772-780.

3.2.- 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.

A Maillo, A Orfao, **AB Espinosa**, JM Sayagués, M Merino, P Sousa, M Lara, MD Tabernero. *Neuro-Oncology*, 2007; 9: 438-446.

- En relación con el segundo objetivo, que perseguía investigar la posible implicación de las alteraciones cromosómicas y de los perfiles de expresión génica de los meningiomas, en el predominio en mujeres de estos tumores:

3.3.- Patient gender is associated with distinct patterns of chromosomal abnormalities and sex chromosome-linked gene-expression profiles in meningiomas.

MD Tabernero, **AB Espinosa**, A Maillo, O Rebelo, J Fernández Vera, JM Sayagués, M Merino, P Díaz, P Sousa, A Orfao. *The Oncologist*, 2007; 12: 1225-1236.

- En relación con el tercer objetivo, relacionado con la caracterización detallada de las anomalías del cromosoma 14 en meningiomas, y el análisis de su posible asociación con las características y el comportamiento evolutivo del tumor:

3.4.- Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase in situ hybridization and comparative genomic hybridization in 124 meningiomas.

MD Tabernero*, **AB Espinosa***, A Maillo, JM Sayagués, MC Algueró, E Lumbreras, P Díaz, JM Gonçalves, I Onzain, M Merino, F Morales, A Orfao. *American Journal of Clinical Pathology*, 2005; 123: 744-751.

3.5.- Array-based comparative genomic hybridization of mapped BAC DNA clones to screen for chromosome 14 copy number abnormalities in meningiomas.

AB Espinosa, C Mackintosh, A Maíllo, L Gutierrez, P Sousa, M Merino, J Ortiz, E de Álava, A Orfao, MD Tabernero. *European Journal of Human Genetics*, 2008 (*in press*).

3.1.- ARTÍCULO 1: La relación citogenética entre meningiomas primarios y recurrentes sugiere la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con alto riesgo de recidiva.

OBJETIVO. La recidiva constituye la complicación clínica más relevante de los meningiomas; sin embargo, seguimos sin conocer cuál es la relación existente entre el tumor primario y el recidivante. El objetivo del presente trabajo se centra en analizar la relación citogenética existente entre el meningioma primario y su recidiva.

MÉTODOS. En este trabajo analizamos las alteraciones numéricas de 12 cromosomas en 59 muestras tumorales correspondientes a 25 pacientes con meningiomas recurrentes, empleando técnica de hibridación in situ fluorescente multicolor sobre suspensiones celulares depositadas en portaobjetos. Además, en 47 de los 59 tumores estudiados, se determinó la distribución de los diferentes clones presentes en el tumor en secciones de tejido incluidas en parafina. En paralelo, se estudiaron 132 casos diagnosticados de forma correlativa a los tumores recurrentes y que no presentaron recidiva.

RESULTADOS. La mayoría de los meningiomas analizados mostraron aberraciones citogenéticas complejas, asociadas con la presencia de dos o más clones distintos de células tumorales en el tumor primario. Además, en la mayoría de los tumores recidivantes (76%), se identificaron exactamente los mismos clones de células tumorales respecto a los detectados en el tumor primitivo. En los demás tumores recidivantes (26%), observamos la aparición de nuevos clones de células tumorales, citogenéticamente relacionados con los detectados en el tumor primario; en ellos

observamos la adquisición de una o más aberraciones cromosómicas adicionales y/o la desaparición de uno o más clones de aquellos que se identificaban en la lesión primaria. El análisis multivariante de factores pronósticos mostró que, el índice pronóstico definido mediante el sistema de puntuación de Maillo et al –basado en la edad del paciente, la clasificación de la OMS y las pérdidas del cromosoma 14–, junto con el tamaño del tumor al diagnóstico, constituían la mejor combinación de variables independientes a la hora de predecir la recidiva tumoral.

CONCLUSIONES. En conjunto, nuestros resultados sugieren que en los meningiomas, la recidiva que sigue a una resección quirúrgica completa, podría deberse al recrecimiento del tumor primario, y raramente al desarrollo de un nuevo tumor independiente del meningioma inicial, al estar relacionados desde el punto de vista citogenético, los clones de células neoplásicas detectados en el tumor primario y la recidiva. Estos hallazgos, sugieren la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en pacientes con meningioma y elevado riesgo de recidiva, particularmente en aquellos pacientes que presentan un índice pronóstico elevado y tumores de gran tamaño.

The Cytogenetic Relationship between Primary and Recurrent Meningiomas Points to the Need for New Treatment Strategies in Cases at High Risk of Relapse

Ana Belén Espinosa,¹ María Dolores Taberero,¹ Angel Maíllo,² José María Sayagués,⁴ Juana Ciudad,⁴ Marta Merino,² María Carmen Alguero,¹ Anne Marie Lubombo,² Pablo Sousa,² Angel Santos-Briz,³ and Alberto Orfao⁴

Abstract Purpose: Recurrence is the major factor influencing the clinical outcome of meningioma patients although the exact relationship between primary and recurrent tumors still needs to be clarified. The aim of the present study is to analyze the cytogenetic relationship between primary and subsequent recurrent meningiomas developed within the same individual.

Experimental Design: Multicolor interphase fluorescence *in situ* hybridization was done for the identification of numerical abnormalities of 12 chromosomes in single-cell suspensions from 59 tumor samples corresponding to 25 recurrent meningioma patients. In 47 of these tumors, the distribution of different tumor cell clones was also analyzed in paraffin-embedded tissue sections. In parallel, 132 nonrecurrent cases were also studied.

Results: Most recurrent meningiomas showed complex cytogenetic aberrations associated with two or more tumor cell clones in the first tumor analyzed. Interestingly, in most individuals (74%), exactly the same tumor cell clones identified in the initial lesion were also detected in the subsequent recurrent tumor samples. In the recurrent tumor samples of the remaining cases (26%), we observed tumor cell clones related to those detected in the initial lesion but which had acquired one or more additional chromosome aberrations associated with either the emergence of new clones with more complex karyotypes or the disappearance of the most representative clones from the primary lesions. Multivariate analysis of prognostic factors showed that the Maíllo et al. prognostic score, based on age of patient, tumor grade, and monosomy 14, together with tumor size was the best combination of independent variables for predicting tumor recurrence at diagnosis.

Conclusion: Overall, our results indicate that the development of recurrent meningiomas after complete tumor resection is usually due to regrowth of the primary tumor and rarely to the emergence of an unrelated meningioma, underlining the need for alternative treatment strategies in cases at high risk of relapse, particularly those with a high Maíllo et al. prognostic score and larger tumors.

Meningiomas are usually considered as benign tumors. Nevertheless, recurrences occur in between 10% and 25% of

cases undergoing a complete resection of the tumor (1–4) and they represent the major factor influencing patient's outcome (3, 5–7). In the last decade, important advances have been made as regards the identification of prognostic factors for predicting recurrence of meningiomas. Thus, the combination of malignant histology, younger age, and monosomy 14 is currently considered as the most relevant triad of adverse prognostic factors for recurrence of meningiomas (3, 4, 7–11). Despite this, recurrences are still observed in histologically benign tumors occurring in older patients who do not carry monosomy 14 (12–14). Because of this and the fact that recurrent meningiomas usually show identical histopathologic characteristics to those observed at diagnosis, the question remains about whether tumor recurrence, even many years after surgery, could be due to regrowth of the tumor, emergence of another meningioma, or both. In fact, among other additional prognostic factors, the extent of the surgical resection has been considered as an obvious prognostic factor because tumors that undergo a wider excision will be less likely to recur (6, 7, 12, 15, 16). In turn, the effectiveness of tumor resection could also be related to its localization (3, 6–8, 15, 17) although this still remains controversial (2, 18). Therefore, with the exception of

Authors' Affiliations: ¹Unidad de Investigación, ²Neurosurgery Service, and ³Department of Pathology, Hospital Universitario de Salamanca and ⁴Centro de Investigación del Cáncer, Cytometry General Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Received 7/7/05; revised 11/16/05; accepted 11/23/05.

Grant support: Grants FIS 01/1564 and FIS 02/0010 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid, Spain; grant HUS2/03 from Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; Fundación MMA, Madrid, Spain; Ministerio de Ciencia y Tecnología, Programa Ramón y Cajal, Madrid, Spain (M.D. Taberero); and grants 02/0010 and 02/9103 from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain (A.B. Espinosa and J.M. Sayagues, respectively).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: A.B. Espinosa and M.D. Taberero contributed equally to this work.

Requests for reprints: María Dolores Taberero Redondo, Hospital Universitario de Salamanca, Laboratorio Unidad de Investigación, Edificio Maternidad 2ª Planta, Paseo de San Vicente 58-182, 37007 Salamanca, Spain. Phone: 34-923-29-12-30; Fax: 34-923-29-46-24; E-mail: tabermer@usal.es.

©2006 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1480

those cases in which complete surgical resection of the tumor cannot be achieved, no definitive systematic demonstration of the exact relationship between diagnostic and recurrent tumors occurring in the same individual has thus far been obtained.

At present, it is well established that meningiomas are genetically heterogeneous tumors which usually show variable patterns of intratumoral clonal evolution due to chromosomal instability (1, 3, 4, 10, 18–25). Interestingly, previous reports suggest that different tumor cell clones could display a distinct distribution throughout the tumor (21, 26). Because of this, detailed analysis of the patterns of intratumoral clonal evolution in diagnostic and subsequent recurrent meningioma samples provides a unique tool for establishing a link between primary and recurrent tumor lesions in individual patients. Previous reports which have explored the chromosome abnormalities in meningioma patients studied at diagnosis and later on at recurrence (19, 27–29) have either included few cases (17, 28, 30, 31) or used conventional cytogenetic techniques which hamper the identification of all tumor cell clones present in a sample due to the relatively low percentage of neoplastic metaphases analyzed from all tumor cells (29). In

turn, multicolor interphase fluorescence *in situ* (iFISH) analyses have not been systematically employed.

In the present study, based on a series of 157 patients, we compared the cytogenetic patterns obtained through iFISH analysis of primary versus recurrent meningiomas sequentially developing in the same individual. Our results indicate that the development of recurrent meningiomas after complete tumor resection is usually due to regrowth of the primary tumor and rarely due to the emergence of an unrelated meningioma. In these patients, tumor size together with the prognostic score proposed by Maillo et al. (8), based on age of patient, tumor histopathology, and the presence of monosomy 14, represented the best combination of independent prognostic factors for predicting recurrence-free survival.

Materials and Methods

Patients. A total of 157 consecutive meningioma patients who underwent a complete surgical resection according to the Simpson criteria (32) at the Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca (Spain) were included in this study (Table 1). Follow-up

Table 1. Clinicobiological characteristics of meningioma patients with disease recurrence (n = 25)

Case no.	Age (y)	Gender	Tumor grade	Tumor histology	Tumor localization	iFISH findings at diagnosis*	No. of recurrences	Relapse-free survival † (mo)	Death
1	13	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	–(1p,9,10,22)/TT	2	12	Yes
2	26	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	Diploid ‡	1	99	No
3	34	Female	1/Benign	Transitional	Cranial base	Diploid	1	38	No
4	35	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	Diploid/TT	3	37	Yes
5	41	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Convexity	–(1p,14,22)/+1q/TT ‡	1	242	No
6	43	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Ventricular	+ (1q,7) /1qA	2	23	Yes
7	43	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Convexity	–1p/+15	1	12	No
8	44	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	Diploid ‡	1	30	No
9	46	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Tentorial	–(1p,14,22) ‡	1	24	No
10	53	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Tentorial	–(14,22) ‡	3	16	Yes
11	54	Female	1/Benign	Transitional	Convexity	–22/TT	2	54	No
12	60	Female	1/Benign	Psammomatous	Tentorial	–22/TT	2	32	No
13	60	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Tentorial	–(1p,10,14,18)	3	49	No
14	63	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Convexity	–(1p,10,14,18,22,Y)	3	23	No
15	71	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Spinal	–(9,18,22,X) /1qA	1	120	No
16	73	Male	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	–(1p,22) /TT	2	38	No
17	76	Female	1/Benign	Meningotheliomatous	Cranial base	–22/TT	1	33	No
18	16	Male	2/Atypical	Atypical	Convexity	–(1p,1q) /+9	2	21	Yes
19	23	Female	2/Atypical	Atypical	Convexity	–14/+ (1q,22,X) /1qA	5	90	Yes
20	33	Male	2/Atypical	Atypical	Ventricular	–(1p,10,Y) /+(9,22) /TT	2	11	Yes
21	34	Female	2/Atypical	Atypical	Cranial base	TT/triploid/1qA	6	23	Yes
22	38	Female	2/Atypical	Atypical	Ventricular	–22/+ (14,17) /TT	2	9	Yes
23	72	Female	2/Atypical	Atypical	Convexity	–(1p,14,22,X) / + (1q,7,9,17) /1qA/TT ‡	1	122	No
24	73	Male	2/Atypical	Atypical	Tentorial	–(1p,14,18,22,Y) / +7/1qA/TT	2	7	No
25	30	Male	3/Anaplastic	Anaplastic	Cranial base	Diploid/TT	1	31	Yes

NOTE: TT, tumor cells undergoing tetraploidization with respect to the previous tumor cell clone; A, genetic amplification; +, chromosome gain; –, chromosome loss.

*Overall chromosome abnormalities detected.

†Relapse-free survival as measured from diagnosis to first relapse.

‡Only one tumor sample analyzed due to lack of enough tumor material for iFISH studies from the other samples.

Table 2. Recurrent meningiomas ($n = 25$): distribution of tumor cell clones in sequential tumor samples obtained at diagnosis and/or subsequent recurrences

Case no.	Clones*	% of cells at diagnosis	% of cells at recurrence					
			1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
1	-(1p,9,10,22)	92	93	93				
	TT	8	7	7				
2	Diploid		100					
3	Diploid	100	100					
4	Diploid	90	95	96	96			
	TT	10	5	4	4			
5	-(1p,14,22)+(1q)		92					
	TT		8					
6	+(7)	46	52					
	+(7)/1qA	46	32					
	+(7,1q)	8	16					
7 [†]	-(1p)	39	0					
	-(1p)+(15)	61	0					
	-(1p,10,14)+(15)	0	90					
	TT	0	10					
8	Diploid	100						
9	-(1p,14,22)	100						
10	-(14,22)				100			
11	-(22)	93	94	94				
	TT	7	6	6				
12	-(22)	90	86	90				
	TT	10	14	10				
13	-(1p,10,14,18)			93	96			
	TT			7	4			
14	-(1p,10,14,18,22,Y)	100	100					
15	-(9,18,22,X)/1qA	93	94					
	TT	7	6					
16	-(1p,22)	91	94	95				
	TT	9	6	5				
17	-(22)	87	87					
	TT	13	13					
18	-(1p,1q)	85	42	45				
	-(1p,1q)+(9)	15	58	55				
19 [†]	-(14)			47	18	40	14	
	-(14)+(22,X)			15	0	0	0	
	-(14)+(22,X,1q)			19	18	10	0	
	-(14)+(22,X)/1qA			19	64	50	60	
	-(1p,14)+(22,X,1q)			0	0	0	26	

(Continued on the following page)

controls, done with magnetic resonance imaging techniques, showed absence of any residual tumor lesion after surgery in all cases, including patients showing recurrence of the tumor. At the closing of this study, 25 patients had relapsed with a median follow-up of 91 ± 46 months (range, 25-181 months) versus 83 ± 49 months (range, 13-170 months) for the nonrecurrent tumors ($P > 0.05$). The overall number of recurrences observed for the 25 relapsed patients was 51, ranging between 1 and 6 recurrences per patient. From them, 12 patients (48%) were males and 13 (52%) were females with a mean age of 46 ± 19 years (range, 13-76 years); there was no family history of meningioma for any of the patients. Tumor localization at diagnosis for recurrent versus nonrecurrent meningioma patients was distributed as follows: cranial base including posterior fossa,

36% versus 33% of the cases; cerebral convexity, 28% versus 24%; parasagittal and tentorial, 20% versus 33%; ventricular, 12% versus 1%; and spinal, 4% versus 10% of the patients. Histologic diagnosis was established according to the WHO criteria (33). At diagnosis, 17 of 25 relapsed patients (68%) and 125 of the 132 nonrelapsed cases (94%) were classified as grade 1 or benign subtypes with a median relapse-free survival of 34 versus 84 months; 7 (28%) versus 6 (5%) were grade 2 or atypical with a median relapse-free survival of 21 versus 94 months; and 1 (4%) versus 1 (1%) were diagnosed as grade 3 or anaplastic tumors with a relapse-free survival of 31 versus 55 months.

From the prognostic point of view, all cases were classified according to the Maillo et al. (8) scoring system based on age of patient (<45,

Table 2. Recurrent meningiomas (n = 25): distribution of tumor cell clones in sequential tumor samples obtained at diagnosis and/or subsequent recurrences (Cont'd)

Case no.	Clones*	% of cells at diagnosis	% of cells at recurrence					
			1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
20 [†]	-(1p,10,Y)	78	0					
	-(1p,10,Y)+(9,22)	13	0					
	TT	9	21					
	-(1p,10,14,Y)	0	61					
	-(1p,10,14)+(9,22)	0	16					
21 [†]	TT	66	56	88	59	73	46	69
	TT/1qA	17	38	0	36	20	0	21
	Triploid	17	6	12	5	7	8	10
	-(X)/1qA/TT	0	0	0	0	0	8	0
	-(X)/TT	0	0	0	0	0	38	0
22	-(22)		20	23				
	-(22)+(17)		35	42				
	-(22)+(14,17)		40	30				
	TT		5	5				
23	-(1p,14,22,X)+(17)					36		
	-(1p,14,22,X)+(17)/1qA					31		
	-(1p,14,22,X)+(1q,7,9,17)					21		
24 [†]	TT					12		
	-(Y)	17	0	0				
	-(Y)/TT	15	40	41				
	-(Y,1p,14,18,22)	48	0	0				
	-(Y,1p,14,18,22)+(7)/1qA	20	0	0				
25	-(Y)+(7)/TT	0	40	40				
	-(Y)/1qA	0	20	19				
	Diploid	96	65					
	TT	4	35					

NOTE: Results expressed as percentage of cells for each clone from all tumor cells in the sample.

*Cytogenetic nomenclature for iFISH according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995. Diploid in female: nuc ish Xcen(DXZ1x2), 1p36(D1Z2x2), 1cen(D1Z5x2), 7cen(D7Z1x2), 9q34(ABLx2), 10cen(D10Z1x2), 11q13(CCND1x2), 14q32.3(IGHx2), 15q22(PMLx2), 17q12-q21(RARAx2), 18q21(BCL2x2), 22q11.2(BCRx2). Diploid in male: nuc ish Xcen(DXZ1x1), Ycen(DYZ3x1), 1p36(D1Z2x2), 1cen(D1Z5x2), 7cen(D7Z1x2), 9q34(ABLx2), 10cen(D10Z1x2), 11q13(CCND1x2), 14q32.3(IGHx2), 15q22(PMLx2), 17q12-q21(RARAx2), 18q21(BCL2x2), 22q11.2(BCRx2). Triploidy in female: nuc ish Xcen(DXZ1x3), 1p36(D1Z2x3), 1cen(D1Z5x3), 7cen(D7Z1x3), 9q34(ABLx3), 10cen(D10Z1x3), 11q13(CCND1x3), 14q32.3(IGHx3), 15q22(PMLx3), 17q12-q21(RARAx3), 18q21(BCL2x3), 22q11.2(BCRx3). -1p: nuc ish 1p36(D1Z2x1); -1q: nuc ish 1cen(D1Z5x1); -9: nuc ish 9q34(ABLx1); -10: nuc ish 10cen(D10Z1x1); -14: nuc ish 14q32.3(IGHx1); -18: nuc ish 18q21(BCL2x1); -22: nuc ish 22q11.2(BCRx1); -X: nuc ish Xcen(DXZ1x1); -Y: nuc ish Ycen(DYZ3-); +1q: nuc ish 1cen(D1Z5x3); +7: nuc ish 7cen(D7Z1x3); +9: nuc ish 9q34(ABLx3); +14: nuc ish 14q32.3(IGHx3); +15: nuc ish 15q22(PMLx3); +17: nuc ish 17q12-q21(RARAx3); +22: nuc ish 22q11.2(BCRx3); +X: nuc ish Xcen(DXZ1x3).

† New chromosomal abnormalities observed in emerging clones, not identified at the first study, are highlighted in bold. TT, tumor cells undergoing tetraploidization with respect to the previous clone; A, genetic amplification.

score = 1; ≥45, score = 0), tumor grade (grade 1, score = 0; grade 2 or 3, score = 1), and the presence (score 1) or absence (score 0) of monosomy 14.

Tumor specimens were obtained by conventional surgical procedures. Part of the tumor showing both macroscopic and microscopic infiltration was divided into two parts. One was fixed in formalin and embedded in paraffin using conventional procedures and the other was employed to prepare single-cell suspensions as previously described in detail (34).

iFISH studies. iFISH analyses were done in diagnostic tumor samples from all 150 patients. Sequential iFISH studies were done in a total of 53 samples (16 diagnostic and 37 relapse tumor samples) corresponding to 19 of the 25 patients studied. A minimum of two different samples was analyzed per patient. In the remaining six recurrent meningiomas, iFISH studies were done exclusively at diagnosis. In addition, to establish the potential existence of

preferential tissue localization of the different clones present in a meningioma tumor sample, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from 47 samples corresponding to 37 patients with at least two distinguishable clones by iFISH were analyzed. In these latter studies, nine different tumor areas were screened per sample.

iFISH assays for the detection of numerical abnormalities of chromosomes 1, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 22, X, and Y were done according to previously reported techniques (34) both on freshly obtained single-cell suspensions, after fixation in methanol/acetic (3:1, v/v), and on unstained 5-µm formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections placed on poly-L-lysine-coated slides (BioGenex, San Ramon, CA). The following commercially available probes, all obtained from Vysis, Inc. (Downers Grove, IL) except the 1p36 Midi-Satellite fluorescein-labeled probe which was purchased from Q-BIOgene (Carlsbad, CA), were systematically used in double stainings: for chromosomes 9 and 22, LSI BCR/ABL dual-color probe; for chromosomes

15 and 17, LSI *PML/RAR- α* dual-color probe; for chromosomes 11 and 14, LSI *IgH/CCND1* dual-color probe; for chromosomes 14 and 18, LSI *IgH/BCL2* dual-color probe; for chromosomes X and Y, CEP X DNA probe, conjugated with Spectrum Orange, and CEP Y DNA probe, conjugated with Spectrum Green; for chromosomes 7 and 10, CEP 7 DNA probe, conjugated with Spectrum Orange, and CEP 10 DNA probe, conjugated with Spectrum Green; for chromosome 1, both the 1p36 midi-satellite fluorescein-labeled probe and the CEP 1q12 DNA probe. Once hybridized, the cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) was used as antifading agent.

A BX60 fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a 100 \times oil objective was used for counting the number of hybridization spots per nuclei; for each slide, a minimum of 200 nuclei were counted. Only those spots with a similar size, intensity, and shape in nonoverlapping nuclei with a distinct nuclear border were evaluated; doublet signals were considered as single spots. The criteria used for the definition of the presence of numerical abnormalities for each individual chromosome, as well as for the definition of a tumor cell clone, were based on the analysis of normal interphase nuclei as previously described in detail (34).

Flow cytometric analysis of tumor cell DNA contents. In all patients studied, flow cytometric measurement of tumor cell DNA contents was done using aliquots of the same freshly frozen diagnostic tumor samples used for iFISH studies as described elsewhere (34, 35) for a minimum of 10^4 events per sample. The presence of DNA aneuploidy was defined based on the identification of two G_0 - G_1 populations of cells with different DNA contents. In DNA aneuploid cases, a second sample aliquot containing normal diploid control cells added to the tumor sample was used to confirm which of the two G_0 - G_1 populations corresponded to the DNA aneuploid tumor cells. DNA index, as well as the cell cycle distribution of tumor cells, was calculated as previously described in detail after excluding cell doublets and debris (35).

Statistical methods. For all variables included in the present study, their mean and median values, SD, and range were calculated using the SPSS 11.0 software package (SPSS, Inc., Chicago, IL). The χ^2 and either the Mann-Whitney *U* or the Kruskal-Wallis test were used to assess the statistical significance of the differences observed between groups for qualitative and quantitative variables, respectively. Survival curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier and the log-rank test was used for their comparison. Cox regression was used for the multivariate analysis of prognostic factors for relapse-free survival. In the multivariate analysis, only those variables showing a significant effect on relapse-free survival in the univariate study were included. Statistical significance was considered to be present when $P < 0.05$.

Results

Chromosomal abnormalities in recurrent meningioma patients as detected by iFISH. iFISH analysis of tumor samples from those patients who relapsed showed variable cytogenetic patterns in the first tumor sample analyzed. Interestingly, only 8 cases (32%) showed either a normal diploid chromosome pattern ($n = 5$) or monosomy 22 associated with small tetraploid clones ($n = 3$). All other cases ($n = 17$; 68%) displayed complex iFISH patterns consisting of multiple chromosome aberrations (Tables 1 and 2). From these 17 cases, 3 (18%) showed one clone with simultaneous loss of between two and six different chromosomes, 7 (41%) displayed two clones, 3 (18%) had three different tumor cell clones, and in the remaining 4 cases (23%), four different tumor cell clones were identified. The exact abnormalities detected in each of these tumor cell clones are shown in Table 2.

Monitoring of chromosomal abnormalities in recurrent follow-up tumor samples. Interestingly, 14 of the 19 (74%) meningi-

oma patients in whom sequential analysis of recurrent tumor samples was done showed tumor cell clones displaying identical cytogenetic aberrations by iFISH as those observed in the initial study. In three of the remaining five patients, at least one of the tumor cell clones identified in the first sample studied showed acquisition of one or more additional aberrations. The chromosomal aberrations acquired included (a) monosomy 14 in association or not with trisomy 9 and 22 and disappearance of the two initially predominant clones in one patient (case 20); (b) variations in two tetraploid clones with acquisition of monosomy X in a second individual (case 21); and (c) acquisition of additional chromosome 1 abnormalities in a tumor cell clone carrying -14 , in association with the disappearance of two minor clones initially detected, in the third case (case 19). One additional patient showed emergence of two new clones: a tetraploid tumor cell clone which was not detected initially, together with acquisition of monosomy 10 and 14 in the most represented clone in the first study (case 7). The fifth case showed the disappearance of the most abundant tumor cell clones observed in the first sample studied (case 24; Table 2).

Tissue localization of different tumor cell clones. Only 1 of 47 samples analyzed showed the clear presence of different tumor cell clones at variable percentages in different areas of the tumor tissue (Fig. 1A and B). In all other tumor samples, simultaneous coexistence of all tumor cell clones was observed in all areas analyzed. However, it should be noted that nuclei from small tetraploid tumor cell clones tended to have larger nuclei and to predominate in areas showing lower cell densities.

Clinicobiological characteristics of recurrent versus nonrecurrent meningioma patients. Table 3 shows the clinical and biological characteristics of the 25 recurrent meningioma patients studied in comparison with a group of 132 patients diagnosed during the same period and who were disease-free by the end of the study. As illustrated, recurrence was associated with a higher frequency of males (48% versus 30%; $P = 0.08$) and younger patients (mean age, 46 ± 19 versus 61 ± 14 years; $P < 0.001$). Moreover, three of four ventricular tumors had recurrence whereas this was observed in only 1 of the 14 spinal meningiomas ($P = 0.01$). In comparison with the nonrecurrent tumor group, recurrent patients also showed larger tumors (average tumor size, 55 ± 19 versus 42 ± 16 mm; $P = 0.003$), a higher incidence of multifocal (20% versus 6%; $P = 0.04$), and histologically aggressive tumors (32% versus 4%; $P < 0.001$), as

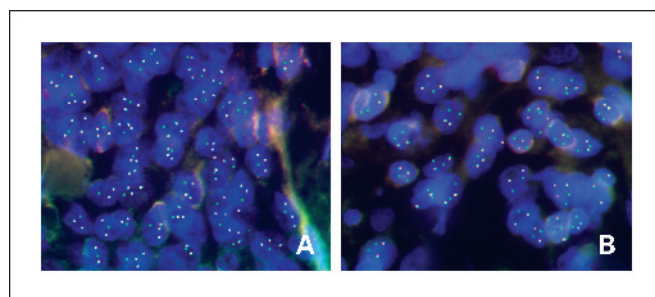


Fig. 1. Illustrative iFISH patterns showing the differential distribution of a tumor cell clone in different areas of the same meningioma tumor tissue sample. A and B, iFISH hybridizations for chromosomes 17 and 22 in two different areas of the same tumor. A, area where the predominant tumor cell clone displayed monosomy 22 (green signals) and trisomy 17 [dual green and red (yellow) spots]; B, area from the same tumor hybridized with the same probes where this tumor cell clone was almost absent.

Table 3. Clinical and biological characteristics of recurrent versus nonrecurrent meningiomas and their prognostic effect for relapse-free survival

	Recurrent meningiomas (n = 25)	Nonrecurrent meningiomas (n = 132)	P, χ^2 test	Prognostic effect for relapse-free survival	
				P, univariate analysis	P, multivariate analysis*
Sex					
Male	12 (48%)	40 (30%)			
Female	13 (52%)	92 (70%)	0.08	0.13	
Age (y)	46 ± 19	61 ± 14	<0.001	<0.0001	0.96
Multifocal tumors	5 (20%)	8 (6%)	0.04	0.02	0.51
Tumor localization					
Ventricular	3 (12%)	1 (1%)			
Convexity	7 (28%)	32 (24%)			
Tentorial	5 (20%)	43 (33%)			
Cranial base	9 (36%)	43 (33%)			
Spinal	1 (4%)	13 (10%)	0.01	0.0002	0.56
Tumor size (mm)	55 ± 19	42 ± 16	0.003	0.002	0.003
Tumor histology					
Meningotheliomatous	14 (56%)	96 (73%)			
Fibroblastic	0 (0%)	1 (1%)			
Transitional	2 (8%)	13 (10%)			
Psammomatous	1 (4%)	15 (11%)			
Atypical	7 (28%)	6 (5%)			
Anaplastic	1 (4%)	1 (1%)	0.003	0.0001	0.99
Tumor grade (WHO)					
1	17 (68%)	124 (96%)			
2/3	8 (32%)	7 (4%)	<0.001	<0.0001	0.64
% of S phase by flow cytometry	1.4 ± 1.3 (0.1-5.4)	1.2 ± 1.9 (0.02-14.3)	0.1	0.97	
DNA aneuploidy by flow cytometry	6 (25%)	21 (17%)	0.4	0.20	
No. tumor cell clones by flow cytometry					
<3 clones	18 (78%)	125 (95%)	0.01	0.0005	0.98
≥3 clones	5 (22%)	6 (5%)			
No. tumor cell clones by iFISH					
<3 clones	16 (64%)	110 (83%)			
≥3 clones	9 (36%)	22 (17%)	0.05	0.02	0.63
Ancestral tumor cell clone					
Diploid/-22	8 (32%)	74 (56%)	0.03	0.03	0.21
Other	17 (68%)	58 (44%)			
Prognostic score †					
0	5 (20%)	92 (70%)			
1	11 (44%)	36 (27%)			
2	7 (28%)	4 (3%)			
3	2 (8%)	0 (0%)	<0.001	<0.0001	0.003
% Deaths	40%	3%	<0.001	NE	NE

NOTE: Results expressed as number of cases and percentage in brackets or as mean ± 1 SD. NE, not evaluated.

*P values for multivariate analysis are shown only for those variables entering this part of the study.

† Maillou et al. (8) prognostic scoring system based on age of patient, tumor grade, and monosomy of chromosome 14.

well as a greater percentage of cases with an adverse prognostic score (score 2 and 3) according to the classification of Maillou et al. (ref. 8; 36% versus 3%; $P < 0.001$). Regarding the frequency of numerical abnormalities for the individual chromosomes analyzed, recurrent meningiomas showed a greater proportion of cases with del(1p36) ($P = 0.006$), del(10q)/

-10 ($P = 0.05$), del(14q)-14 ($P < 0.001$), del(18q)-18 ($P = 0.01$), gains of chromosomes 1q ($P = 0.004$), 7 ($P = 0.02$), 9 ($P < 0.001$), and 22 ($P = 0.005$) and of women with monosomy X ($P = 0.005$) with respect to nonrecurrent cases (Table 4). In addition, recurrent meningiomas showed a higher proportion of cases carrying three or more tumor cell clones

by both iFISH and flow cytometry DNA analysis ($P = 0.05$ and $P = 0.01$, respectively). By contrast, recurrent meningiomas had diploid or -22 ancestral tumor cell clones less frequently than the nonrecurrent tumor group (32% versus 56%; $P = 0.03$; Table 3). As expected, a higher incidence of deaths (40% versus 3%; $P < 0.001$) and a lower overall survival were observed among recurrent cases (median overall survival, 255 months versus not reached; $P = 0.0001$). Multivariate analysis of prognostic factors for relapse-free survival showed that the prognostic score proposed by Maillou et al. (8), which takes into account tumor grade, age of patient, and chromosome 14 abnormalities ($P = 0.003$), together with tumor size ($P = 0.003$) was the best combination of independent variables for predicting patient outcome.

Discussion

Recurrence is the major clinical complication of meningiomas occurring in up to one quarter of all patients undergoing curative surgery (1–4) as also found in our series. Despite the identification of predictive factors for tumor recurrence, its exact nature remains largely unknown. Accordingly, tumor recurrence after complete surgical resection could be due to the local persistence of tumor cells with clonogenic capacity because of tumor seeding during surgery, microinvasion of lymphatic vessels and other tissues, or an incomplete microscopic resection of the tumor. Alternatively, a new tumor, independent from the first meningioma, could develop in the same individual because of a favorable genetic and/or environmental background.

The aim of the present study was to provide evidence about the exact nature of recurrent meningiomas. To the best of our knowledge, this is the first report in which genetic evidence for a direct link between primary and recurrent meningiomas developing in the same individual is provided through the comparison of the tumor cell clones present in each tumor sample, as identified by multicolor iFISH. In line with our previous observations (8, 34), the systematic use of 13 probes specific for an identical number of chromosome regions commonly deleted or gained in meningiomas allowed the identification of two or more tumor cell clones within a tumor sample in the majority of the meningiomas, particularly in recurrent cases. Investigation of the distribution within a tumor sample of the different clones identified showed the admixture at different proportions of all tumor cell clones in most (46 of 47) samples analyzed. Apparently, these results are in contrast with those reported by Pfisterer et al. (26) who found different chromosomal abnormalities in different areas of the tumor. However, it should be noted that in those tumors showing a small fraction of tetraploid cells, which usually had a higher nuclear size, these cells displayed a tendency to predominate in areas with lower cell densities. Based on these results, the investigation of the persistence of the same tumor cell clones or the appearance of new related clones in recurrent meningiomas developed within the same individual after complete tumor resection could be a potentially useful tool to establish the relationship between primary and recurrent meningiomas. Interestingly, in most individuals analyzed, exactly the same tumor cell clones identified in the initial lesion were also detected in the recurrent meningiomas. Moreover, in the remaining cases, we observed tumor cell clones related to those observed in the primary tumor but which had acquired

one or more additional chromosome aberrations related to either the appearance of new clones or the disappearance of the most representative clones from the primary lesions. Altogether, these results provide strong evidence for a direct relationship between primary tumors and recurrent lesions in virtually all meningiomas. Of note, in those cases showing the emergence of new chromosomal abnormalities in recurrent meningiomas, the presence of more complex cytogenetic iFISH patterns was observed, in keeping with the notion that tumor progression is associated with the sequential accumulation of additional genetic abnormalities, most often involving deletions of chromosomes 1p and monosomy 14 (1, 3, 8, 10, 21, 23, 24, 27, 29).

Interestingly, comparison between the initial tumors from individuals showing recurrence versus those from nonrecurrent patients showed a significantly higher frequency of cases displaying complex iFISH patterns and a greater number of tumor cell clones among the former group. This finding supports previous observations showing that the presence of specific chromosome abnormalities, such as monosomy 14, del(1p36), gains of chromosome 22, and complex karyotypes, but not monosomy 22, is associated with a worse clinical outcome, as reflected by both higher recurrence and shorter relapse-free survival rates (1, 8, 10, 19, 21, 36–38). However, none of the chromosomal abnormalities detected could on its own explain all recurrences. In fact, one quarter of all recurrent meningiomas studied showed a diploid or -22 ancestral tumor cell clones. In such cases, additional genetic abnormalities together with other disease features would probably explain the occurrence of tumor recurrence. In line with this, mutations of the *NF2* gene at chromosome 22q12.2 have been reported in a variable percentage of cytogenetically diploid tumors, this molecular abnormality being not explored in our cases. In addition, some of these latter recurrent meningiomas corresponded to younger patients, another well-recognized adverse prognostic factor (8, 11).

Other clinical characteristics of meningioma patients which have been associated with recurrent tumors include tumor histology (3, 4, 7–10), patient gender (4, 6, 7, 20, 39, 40), tumor localization (3, 6–8, 15), and proliferation rate (6, 13, 41, 42). In the present study, recurrent meningiomas also occurred more frequently in histologically malignant tumors and among males whereas they showed similar proliferation rates to nonrecurrent meningiomas. In turn, most ventricular meningiomas relapsed whereas all, except one, spinal tumors did not. Although it could be speculated that some specific tumor localizations (e.g., ventricular) could be associated with more conservative surgical resection procedures than others (e.g., spinal), most ventricular tumors were histologically malignant, showed adverse cytogenetic features, and displayed an adverse prognostic score according to Maillou et al. (8) whereas all, except one, spinal meningiomas were histologically benign and displayed a diploid or -22 homogeneous tumor cell population. These findings could help to explain the different recurrence rates observed for tumors occurring at different localizations in the present study. In fact, multivariate analysis of prognostic factors showed that the prognostic score proposed by Maillou et al. (8), in which age of patient, tumor grade, and monosomy 14 are considered, together with tumor size was the best combination of independent variables for predicting tumor recurrence.

Table 4. Molecular cytogenetic data of meningioma tumors according to tumor histopathology, the occurrence of tumor recurrence, and its prognostic effect on relapse-free survival

	Grade 1 (n = 142)	Grade 2/3 (n = 15)	P	Recurrence (n = 25)	Nonrecurrence (n = 132)	P	Prognostic impact for relapse-free survival	
							P, univariate analysis	P, multivariate analysis*
Chromosome 1p36								
Diploid	96 (75%)	4 (31%)	0.001	9 (43%)	91 (76%)	0.006	0.0008	0.97
Loss	31 (24%)	8 (61%)		11 (52%)	28 (23%)			
Gain	1 (8%)	1 (8%)		1 (5%)	1 (1%)			
Chromosome 1q								
Diploid	126 (88%)	8 (54%)	0.000	16 (64%)	118 (89%)	0.004	0.003	0.84
Loss	1 (1%)	2 (13%)		1 (4%)	2 (2%)			
Gain	15 (11%)	5 (33%)		8 (32%)	12 (9%)			
Chromosome 7								
Diploid	117 (95%)	8 (67%)	0.001	15 (79%)	110 (95%)	0.02	0.008	0.45
Loss	1 (1%)	0 (0%)		0 (0%)	1 (1%)			
Gain	5 (4%)	4 (33%)		4 (21%)	5 (4%)			
Chromosome 9								
Diploid	135 (95%)	11 (73%)	0.001	19 (76%)	127 (96%)	<0.001	<0.0001	0.24
Loss	2 (1%)	0 (0%)		2 (8%)	0 (0%)			
Gain	5 (4%)	4 (27%)		4 (16%)	5 (4%)			
Chromosome 10								
Diploid	131 (92%)	10 (68%)	0.001	20 (80%)	121 (92%)	0.05	0.01	0.83
Loss	5 (4%)	4 (27%)		4 (16%)	5 (4%)			
Gain	6 (4%)	1 (7%)		1 (4%)	6 (4%)			
Chromosome 11								
Diploid	75 (98%)	5 (83%)	0.06	16 (94%)	64 (97%)	0.5	0.45	
Loss	1 (1%)	0 (0%)		0 (0%)	1 (1%)			
Gain	1 (1%)	1 (17%)		1 (6%)	1 (1%)			
Chromosome 14								
Diploid	121 (86%)	8 (54%)	0.002	14 (56%)	115 (87%)	0.001	<0.0001	0.98
Loss	19 (13%)	5 (33%)		9 (36%)	15 (11%)			
Gain	2 (1%)	2 (13%)		2 (8%)	2 (2%)			
Chromosome 15								
Diploid	135 (95%)	11 (74%)	0.000	23 (92%)	123 (93%)	0.7	0.64	
Loss	0 (0%)	2 (13%)		0 (0%)	2 (2%)			
Gain	7 (5%)	2 (13%)		2 (8%)	7 (5%)			
Chromosome 17								
Diploid	133 (94%)	9 (60%)	0.000	22 (88%)	120 (91%)	0.5	0.53	
Loss	1 (1%)	2 (13%)		0 (0%)	3 (2%)			
Gain	8 (6%)	4 (27%)		3 (12%)	9 (7%)			
Chromosome 18								
Diploid	101 (90%)	7 (55%)	0.000	15 (75%)	93 (88%)	0.01	0.005	0.51
Loss	6 (5%)	5 (25%)		5 (25%)	6 (6%)			
Gain	5 (5%)	0 (0%)		0 (0%)	6 (6%)			
Chromosome 22								
Diploid	61 (43%)	4 (27%)	0.000	9 (36%)	56 (42%)	0.005	0.0003	0.53
Loss	81 (57%)	7 (46%)		13 (52%)	75 (57%)			
Gain	0 (0%)	4 (27%)		3 (12%)	1 (1%)			
Chromosome X								
Diploid	130 (91%)	9 (60%)	0.000	21 (84%)	118 (89%)	0.005	0.001	0.11
Loss	12 (9%)	4 (27%)		2 (8%)	14 (11%)			
Gain	0 (0%)	2 (13%)		2 (8%)	0 (0%)			
Chromosome Y								
Diploid	34 (77%)	5 (62%)	0.37	9 (75%)	30 (75%)	1.00	0.83	
Loss	10 (23%)	3 (38%)		3 (25%)	10 (25%)			

NOTE: Results expressed as number of cases and percentage in brackets.

*P values for multivariate analysis are shown only for those variables entering this part of the study.

Interestingly, no differences were observed as regards the prognostic value of the Maillo et al. score once each score group was separately considered or when the two adverse prognostic factors (scores 2 and 3) were considered together (data not shown). Altogether, these results indicate that younger patients who have tumors with a large size, adverse histologic features, and/or monosomy 14 are more prone to develop recurrence which, according to our data, could be due to the persistence of tumor cells even after a macroscopically complete tumor resection. As expected (3, 5–7, 43), tumor recurrence was also associated with a significantly higher frequency of deaths and shorter overall survival rates, confirming that recurrence

represents a major prognostic factor for overall survival in meningioma patients.

In summary, our results provide strong evidence about the existence of a direct relationship between primary and subsequent recurrent meningiomas in patients undergoing curative surgery, with younger patients who have larger tumors with adverse histologic features and/or monosomy 14 being more prone to develop tumor recurrence. These observations, together with the confirmed adverse prognostic effect of tumor recurrence on the overall survival of meningioma patients, underline the need for alternative therapeutic strategies in patients at high risk of relapse.

References

- 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 meningial sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;110:103–10.
- 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;92:401–5.
- Ketter R, Henn W, Niedermayer I, et al. Predictive value of progression-associated chromosomal aberrations for the prognosis of meningiomas: a retrospective study of 198 cases. *J Neurosurg* 2001;95:601–7.
- Mihaila D, Jankowski M, Gutierrez JA, et al. Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res* 2003;9:4443–51.
- Mathiesen T, Lindquist C, Kihlstrom L, Karlsson B. Recurrence of cranial base meningiomas. *Neurosurgery* 1996;39:2–9.
- Hunt DP. Predicting meningioma recurrence. *Clin Oncol* 1999;11:398–404.
- Ayerbe J, Lobato RD, de la Cruz J, et al. Risk factors predicting recurrence in patients operated on for intracranial meningioma. A multivariate analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 1999;141:921–32.
- Maillo A, Orfao A, Sayagues JM, 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;21:3285–95.
- Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM. Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery* 1993;33:955–63.
- 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.
- Stafford SL, Perry A, Suman VJ, et al. Primarily resected meningiomas: outcome and prognostic factors in 581 Mayo Clinic patients, 1978 through 1988. *Mayo Clin Proc* 1998;73:936–42.
- Schick U, Marquardt G, Lorenz R. Recurrence of benign spinal neoplasms. *Neurosurg Rev* 2001;24:20–5.
- Yamasaki F, Yoshioka H, Hama S, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K. Recurrence of meningiomas. *Cancer* 2000;89:1102–10.
- Kamitani H, Masuzawa H, Kanazawa I, Kubo T. Recurrence of convexity meningiomas: tumor cells in the arachnoid membrane. *Surg Neurol* 2001;56:228–35.
- Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 1985;62:8–24.
- Kalala JP, Caemaert J, De Ridder L. Primary resected meningiomas: relapses and proliferation markers. *In Vivo* 2004;18:411–6.
- Murata J, Sawamura Y, Saito H, Abe H. Resection of a recurrent parasagittal meningioma with cortical vein anastomosis: technical note. *Surg Neurol* 1997;48:592–7.
- Steu-del WI, Feld R, Henn W, Zang KD. Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. *Acta Neurochir Suppl* 1996;65:73–6.
- 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;101:210–8.
- Zang KD. Meningioma: a cytogenetic model of a complex benign human tumor, including data on 394 karyotyped cases. *Cytogenet Cell Genet* 2001;93:207–20.
- 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;60:628–36.
- Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:275–86.
- Simon M, von Deimling A, Larson JJ, et al. Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 1995;55:4696–701.
- Weber RG, Bostrom J, Wolter M, 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;94:14719–24.
- Lee JY, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King JT, Jr., Omalu B. Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery* 2004;55:1163–73.
- Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC, et al. Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro-oncol* 2004;6:290–9.
- Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, et al. Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent *in situ* hybridization. *Cancer* 1998;83:360–6.
- von Deimling A, Larson J, Wellenreuther R, et al. Clonal origin of recurrent meningiomas. *Brain Pathol* 1999;9:645–50.
- 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;125:119–24.
- Conrad MD, Schonauer C, Pelissou-Guyotat I, Morel C, Madarassy G, Deruty R. Recurrent lumbosacral metastases from intracranial meningioma. Report of a case and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)* 2001;143:935–7.
- Doita M, Harada T, Nishida K, Marui T, Kurosaka M, Yoshiya S. Recurrent calcified spinal meningioma detected by plain radiograph. *Spine* 2001;26:249–52.
- Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20:22–39.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215–25.
- Sayagues JM, Taberero MD, Maillo A, et al. Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn* 2004;6:316–25.
- Vindelov LL, Christensen IJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1990;11:753–70.
- Maillo A, Diaz P, Sayagues JM, et al. Gains of chromosome 22 by fluorescence *in situ* hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer* 2000;92:377–85.
- Taberero MD, Espinosa AB, Maillo A, et al. Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase *in situ* hybridization (iFISH) and comparative genomic hybridization (CGH) in 124 meningiomas: correlation with the clinical, histopathological and prognosis features of the disease. *Am J Clin Pathol* 2005;123:744–51.
- 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;85:113–7.
- 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.
- Black PM. Meningiomas. *Neurosurgery* 1993;32:643–57.
- Arai H, Beppu T, Wada T, et al. Pathological analyses of early recurrence and malignant transformation in meningiomas. *Brain Tumor Pathol* 1998;15:37–40.
- Ho DM, Hsu CY, Ting LT, Chiang H. Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. *Cancer* 2002;94:1538–47.
- Nicolato A, Foroni R, Pellegrino M, et al. Gamma knife radiosurgery in meningiomas of the posterior fossa. Experience with 62 treated lesions. *Minim Invasive Neurosurg* 2001;44:211–7.

3.2.- ARTÍCULO 2: Las recidivas precoces de meningiomas histológicamente benignos o de grado I se asocian con tumores de gran tamaño en los que coexisten la presencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral.

OBJETIVO. La recidiva tumoral constituye la complicación clínica más grave de los meningiomas. Aunque en términos absolutos, la mayoría de las recidivas corresponden a tumores histológicamente benignos (tumores de grado I de la clasificación de la OMS), seguimos sin disponer de sistemas que faciliten su predicción al diagnóstico. En el presente trabajo hemos analizado el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas y del grado de heterogeneidad genética de un grupo de 149 meningiomas de grado I, junto con otras características clínico-biológicas de la enfermedad, a la hora de predecir la recidiva precoz del tumor.

MÉTODOS. En conjunto, se estudiaron un total de 149 meningiomas histológicamente benignos, correspondientes a pacientes en los que se realizó una resección completa del tumor. Mediante hibridación *in situ* fluorescente multicolor sobre núcleos interfásicos (iFISH) se determinó la presencia de alteraciones para 12 cromosomas diferentes, y su perfil de distribución en diferentes clones tumorales; en paralelo, se recogió información sobre otras características clínico-biológicas e histopatológicas relevantes de la enfermedad, con el fin de determinar su impacto en la supervivencia libre de recaída a los 30, 60 y 120 meses.

RESULTADOS. Desde el punto de vista pronóstico, las pérdidas de los cromosomas 9, 10, 14 y 18 y la del(1p36) se asociaron con una menor supervivencia

libre de recidiva a los 2.5, 5 y 10 años. De forma similar, los meningiomas benignos de grado I que presentaron coexistencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral, mostraron una mayor frecuencia de recidivas tempranas. De hecho, la coexistencia de del(14q) y del(1p36) en el clon tumoral ancestral, junto con el tamaño del tumor, constituían la mejor combinación de factores pronósticos independientes para la identificación al diagnóstico, de aquellos pacientes con elevado riesgo de sufrir una recurrencia precoz de la enfermedad.

CONCLUSIONES. En resumen, nuestros resultados indican que los pacientes con meningiomas histológicamente benignos de tamaño > 5cm y que presentan coexistencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral, tienen una mayor probabilidad de sufrir una recidiva precoz, incluso después de haberseles realizado una exéresis completa del tumor. Estos hallazgos sugieren la necesidad de realizar un seguimiento más cercano de este subgrupo de pacientes con meningioma, en los primeros años después del diagnóstico y la cirugía.

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

Angel Maillo, Alberto Orfao, Ana B. Espinosa, José María Sayagués, Marta Merino, Pablo Sousa, Monica Lara, and María Dolores Tabernero

Neurosurgery Service (A.M., M.M., P.S., M.L.) and Investigation Unit/IECSCYL (A.B.E., M.D.T.), University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; and Department of Medicine, Cancer Research Center and Cytometry Service, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain (A.O., J.M.S.)

Tumor recurrence is the major clinical complication in meningiomas, and its prediction in histologically benign/grade I tumors remains a challenge. In this study, we analyzed the prognostic value of specific chromosomal abnormalities and the genetic heterogeneity of the tumor, together with other clinicobiological disease features, for predicting early relapses in histologically benign/grade I meningiomas. A total of 149 consecutive histologically benign/grade I meningiomas in patients who underwent complete tumor resection were prospectively analyzed. Using interphase fluorescence in situ hybridization, we studied the prognostic impact of the abnormalities detected for 11 different chromosomes, together with other relevant clinicobiological and histopathological characteristics of the disease, on recurrence-free survival (RFS) at 2.5, 5, and 10 years. From the prognostic point of view, losses of chromosomes 9, 10, 14, and 18 and del(1p36) were associated with a shorter RFS at 2.5, 5, and 10 years. Similarly, histologically benign/grade I meningiomas showing coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone displayed a

higher frequency of early relapses. In fact, coexistence of -14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone, together with tumor size, represented the best combination of independent prognostic factors for the identification of those patients with a high risk of an early relapse. Our results indicate that patients with large histologically benign/grade I meningiomas carrying monosomy 14 and del(1p36) in their ancestral tumor cell clone have a high probability of relapsing early after diagnostic surgery. These findings suggest the need for closer follow-up in this small group of patients. *Neuro-Oncology* 9, 438–446, 2007 (Posted to *Neuro-Oncology* [serial online], Doc. D06-00125, August 17, 2007. URL <http://neuro-oncology.dukejournals.org>; DOI: 10.1215/15228517-2007-026)

Keywords: ancestral tumor cell clone, benign/grade I meningiomas, chromosomal abnormalities, cytogenetics, del(1p36), early recurrence, monosomy 14, prognostic factors

Tumor recurrence is the major clinical complication of meningiomas, occurring in between 10%–15% and 25%–37% of patients undergoing curative surgery after a 5- to 10-year follow-up period, respectively. Although relapses may occur 10 or more years after complete tumor resection, in a high proportion of

Received July 27, 2006; accepted December 20, 2006.

Address correspondence to Angel Maillo, Servicio de Neurocirugía, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente, 58, 37007 Salamanca, Spain (a_maillo@yahoo.es).

cases they develop in the first years following curative surgery. Among other disease features, such as patient age, tumor location, extent of tumor resection, and proliferation-associated markers,¹⁻⁵ tumor histology has long proven to be a powerful independent prognostic factor for recurrence-free survival (RFS). Accordingly, while only a minor proportion of all histologically benign/grade I meningiomas relapse, most atypical and anaplastic tumors do recur in the first years after complete surgical removal of the lesion.⁶⁻²⁰ However, in absolute numbers, the majority of the relapses correspond to histologically benign meningiomas, even among those cases showing recurrence early after diagnosis. In line with this, more recent studies have shown that specific genetic abnormalities such as del(1p36) and monosomy 14 alone or combined in the ancestral tumor cell clone as assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH) in association with clinicopathological disease features such as tumor size and/or patient age^{15,21-31} can be of further help in predicting outcome, independent of tumor histology. Despite this, prediction of those relapses occurring among histologically benign tumors in the first years following diagnostic surgery still remains a major challenge.

In the present study, we prospectively analyzed the prognostic value of specific chromosomal abnormalities and the genetic heterogeneity of the tumor, together with other clinicobiological disease features, for predicting early relapses in histologically benign/grade I meningiomas. Our results, based on a series of 149 patients who underwent complete tumor resection, show that most relapses occurring during the first 2.5 years after surgery correspond to large tumors in which del(1p36) and monosomy 14 coexist in the ancestral tumor cell clone, providing a new scoring system for the stratification of histologically benign tumors at diagnosis, according to risk of early relapse.

Materials and Methods

Patients

A total of 149 patients with histologically benign/grade I meningiomas (43 males, 106 females; mean age, 59 ± 14 years; range, 13–84 years) from a series of 171 consecutive patients diagnosed with meningioma at the Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca were prospectively included in this study. In all cases, histological diagnosis and classification were performed by an experienced neuropathologist according to WHO criteria³² and confirmed by a second independent experienced neuropathologist. A total of 22 cases were not entered into the study: eight were excluded due to incomplete resection of the tumor, and 14 corresponded to grade II and grade III tumors. In all other cases, a complete surgical resection of the tumor was performed according to the Simpson's criteria³³ (grade 1, 4%; grade 2, 35%; grade 3, 61%).

According to tumor localization, most ($n = 134$; 90%) meningiomas corresponded to intracranial tumors, and only 15 (10%) were spinal meningiomas. According to

their intracranial localization, the former tumors were distributed as follows: convexity, 27%; parasagittal and tentorial, 33%; ventricular, 2%; and cranial base, 38%. The great majority of the tumors corresponded to meningotheliomatous meningiomas (78%), 12% were psammomatous tumors, 9% were transitional, and 1% were fibroblastic meningiomas. Following diagnostic surgery, none of the patients received any additional antitumor-directed therapy. Tumor size was reported as the longest diameter of the tumor mass on MR or CT images.

Median follow-up at the moment of closing this study was 73 months (range, 6–241 months). Follow-up studies were performed according to a standardized clinicobiological protocol, including MRI techniques performed 3 months after surgery and every 12 months thereafter; whenever clinical signs and/or symptoms were noted and a relapse was suspected, additional MRI studies were performed. In recurrent meningiomas, histological diagnosis was confirmed after tumor resection, and all recurrent cases showed histological behavior identical to that of the corresponding meningiomas studied at diagnosis.

Interphase FISH Studies

In all cases, freshly frozen tumor samples obtained at diagnostic surgery were used for interphase FISH (iFISH) analysis of numerical abnormalities of chromosomes 1p, 1q, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 22, X, and Y according to techniques that have been previously described in detail.^{15,34,35} Based on the iFISH patterns, the presence of one or more tumor cell clones was defined as previously described.³⁶ To define intratumoral clonal evolution in those tumors with multiple subclones, we assumed that karyotypic abnormalities shared by all subclones represented the earliest changes, whereas the latter cytogenetic changes would be present in only some of the tumor cell clones. In all those cases in which two or more cell clones were present by iFISH, an ancestral tumoral cell clone could be identified as that carrying only those karyotype abnormalities common to all tumor cells.

Seventy cases (47%) showed the presence of a single tumor cell clone, with 55 of these cases (79%) consisting of either diploid tumor cells with no abnormalities for any of the chromosomes studied ($n = 46$; 66%) or neoplastic cells carrying monosomy 22 ($n = 9$; 13%) as the sole cytogenetic alteration; in the other 15 patients (21%), different chromosomal abnormalities were detected. In turn, 79 cases (53%) showed two or more tumor cell clones by iFISH. In these cases, the ancestral tumor cell clone frequently showed losses of one or more chromosomes ($n = 72$; 92%); these corresponding to -22 alone (32 cases; 41%) or associated with other chromosome losses ($n = 21$; 27%), loss of chromosome 1p36 ($n = 21$; 27%), monosomy 14 ($n = 11$; 14%), and nullosomy Y in males ($n = 5$; 6%). Numerical abnormalities of chromosomes 7 (3%), 9 (4%), 10 (7%), 11 (1%), 15 (3%), 17 (5%), 18 (3%), and X (7%) were detected in a minority of cases.

Statistical Methods

For all continuous variables included in the study, mean values and their standard deviation and range were calculated using SPSS (version 11.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA); for categorical variables, frequencies were used. To establish the statistical significance of the differences observed between groups, the Student *t*-test and Mann-Whitney *U*-test were used for continuous variables; for qualitative variables, the chi-square test was applied (cross-tab; SPSS). RFS curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier, and the one-sided log-rank test was used to establish the statistical significance of the differences observed between curves (survival; SPSS). Multivariate analysis of prognostic factors for RFS was performed using the Cox stepwise regression model (regression; SPSS). In this part of the study, only those variables showing a significant association with RFS in the univariate analysis were included. Values of *p* lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Overall, at the moment of closing this study, 20 of the 149 cases studied had relapsed, with nine of the relapses occurring during the first 30 months after diagnostic surgery (median time to recurrence, 30 months; Table 1); among the other 11 relapses, four occurred between months 39 and 60 after diagnostic surgery, five between months 61 and 120, and the other two recurrences were diagnosed at months 122 and 241 of follow-up. From the prognostic point of view, losses of chromosomes 9 (*p* = 0.01), 18 (*p* = 0.005), 10 (*p* < 0.0001), and 14 (*p* = 0.001) and del(1p36) (*p* = 0.008) were associated with a shorter RFS at 2.5 years, the latter three also showing a significant impact on RFS at both 5 and 10 years (Table 2). Similarly, histologically benign/grade I meningiomas showing coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone displayed a higher frequency of relapses during the first 30 months

after diagnostic surgery (*p* < 0.0001) as well as at 5 and 10 years (*p* = 0.0003 and *p* < 0.0001, respectively; Table 2, Fig. 1E). Other clinical features of the disease showing an adverse impact on the occurrence of tumor relapses included (1) male gender (*p* = 0.01), ventricular tumors (*p* = 0.05), and tumor size > 50 mm in diameter (*p* < 0.0001) at 2.5 years; (2) younger patient age (*p* = 0.02) and tumor size > 50 mm (*p* = 0.004) at 5 years; and (3) younger patient age (*p* = 0.002), male gender (*p* = 0.05), and tumor size > 50 mm (*p* = 0.003) at 10 years (Table 2, Fig. 1A–D).

Multivariate analysis of prognostic factors for RFS at 30 months showed that tumor size (*p* = 0.008) together with coexistence of both del(1p36) and monosomy 14 in the ancestral tumor cell clone (*p* = 0.001) was the best combination of independent parameters for predicting RFS early after diagnosis in histologically benign/grade I meningiomas. Interestingly, at both 5 and 10 years of follow-up, in addition to tumor size and the karyotype of the ancestral tumor cell clone, patient age (*p* = 0.008 and *p* = 0.001, respectively) and abnormalities of chromosome 10 (*p* = 0.004 and *p* = 0.01, respectively) also proved to have independent prognostic value for RFS in benign/grade I meningiomas (Tables 2 and 3). Based on these results, a prognostic score was built. Patients carrying tumors larger than 50 mm as well as those carrying both del(1p36) and monosomy 14 as the earliest detectable chromosome lesions were assigned a score of 1 each. Based on this score, three different groups of patients at distinct risk of early recurrence were identified: a good prognostic category that included most cases (*n* = 92), with a score of 0 and a recurrence risk at 30, 60, and 120 months of 0%, 5%, and 8%, respectively; an intermediate group (*n* = 46) with a score of 1 and a relapse risk of 7%, 11%, and 11% at 2.5, 5, and 10 years, respectively; and a poor prognostic category, with only 11 cases, showing a score of 2 and risk of relapse at 2.5, 5, and 10 years of 45%, 45%, and 45%, respectively (*p* < 0.0001; Fig. 1F). Although none of the other variables analyzed significantly improved prediction of RFS at 2.5 years in the multivariate study, other cytoge-

Table 1. Clinical, histopathological, and cytogenetic characteristics of those meningioma patients showing relapse within the first 30 months after complete tumor resection at diagnostic surgery

Case No.	Age	Gender	Tumor Location	Histological Subtype	iFISH Findings at Diagnosis	Time from Diagnosis to Relapse (Months)
1	13	Female	Cranial base	Meningotheliomatous	-1p, -9, -10, -22/TT	12
2	60	Male	Parasagittal	Meningotheliomatous	-1p, -10, -14q	29
3	46	Male	Parasagittal	Meningotheliomatous	-1p, -14q, -22	24
4	43	Female	Ventricular	Meningotheliomatous	+7	23
5	65	Male	Tentorial	Meningotheliomatous	-Y	12
6	63	Male	Convexity	Meningotheliomatous	-1p, -10, -14q, -22, -Y	23
7	43	Male	Convexity	Meningotheliomatous	-1p, -14q, -10/+15	11
8	60	Female	Convexity	Meningotheliomatous	-1p, -14q, -22, +9	22
9	50	Male	Parasagittal	Meningotheliomatous	-22, -14q	27

Abbreviations: iFISH, interphase fluorescence in situ hybridization; TT, tetraploidy.

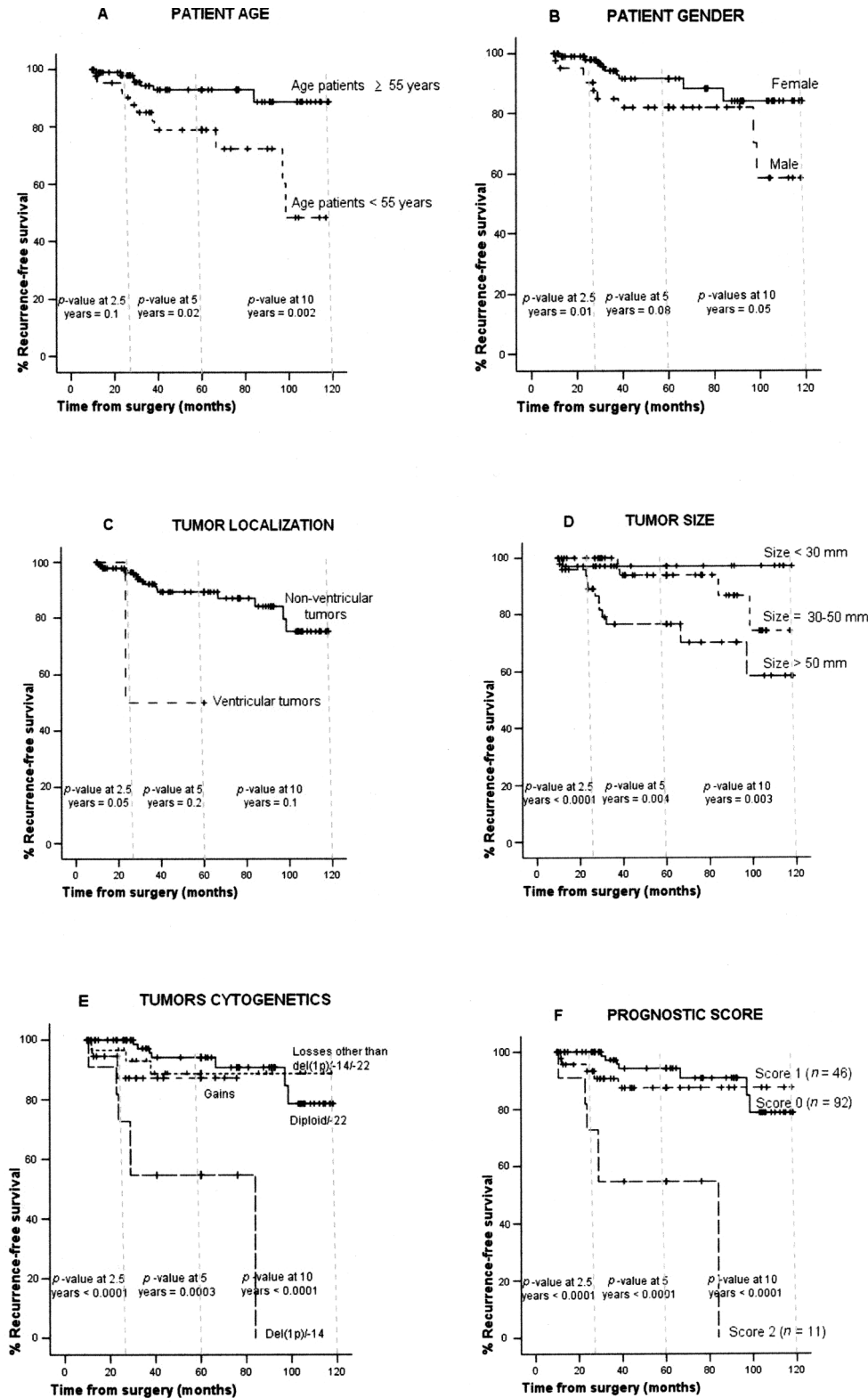


Fig. 1. Recurrence-free survival (RFS) at 30, 60, and 120 months of histologically benign/grade I meningioma tumors (n = 149), according to patient age (A), gender (B), tumor location (C), tumor size (D), and the cytogenetic abnormalities detected in the ancestral tumor cell clone defined as the tumor cell clone carrying only those chromosomal abnormalities common to all tumor cells in the sample (E: diploid/-22; losses other than -22 or -1p/-14; gains; -1p/-14). F shows RFS curves at 30, 60, and 120 months according to the proposed prognostic score for predicting early relapses in histologically benign/grade I meningiomas. In this prognostic score, two variables were considered with a prognostic score of either 0 or 1: tumor size (score 0 for tumors < 50 mm, score 1 for tumors > 50 mm) and the presence (score 1) or absence (score 0) of both monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone.

Table 2. Prognostic impact of the cytogenetic characteristics of histologically benign/grade I meningiomas on early recurrence-free survival (n = 149)

Variable	Group	No. Patients (%)	% Recurrences from Total Cases	Prognostic Factors for Recurrence-Free Survival								
				75% Recurrence-Free Survival			Univariate Analysis (p Value)			Multivariate Analysis (p Value)		
				30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m
Chromosome 1p36	Diploid	92 (62)	3	NR	NR	NR	0.008	0.009	0.01	0.06	0.05	0.05
	Losses	32 (23)	18	NR	NR	84 m						
	Gains	22 (15)	0	NR	NR	97 m						
Chromosome 1q	Diploid	108 (73)	6	NR	NR	NR	0.9	0.8	0.8			
	Losses	1 (1)	0	NR	NR	NR						
	Gains	39 (26)	5	NR	NR	NR						
Chromosome 7	Diploid	97 (73)	6	NR	NR	98 m	0.7	0.4	0.6			
	Losses	0 (0)	0	NR	NR	NR						
	Gains	36 (27)	8	NR	NR	NR						
Chromosome 9	Diploid	107 (72)	6	NR	NR	NR	0.01	0.8	0.07	0.7	0.3	0.4
	Losses	2 (1)	50	12 m	12 m	12 m						
	Gains	40 (27)	5	NR	NR	97 m						
Chromosome 10	Diploid	104 (70)	6	NR	NR	NR	<0.0001	0.0001	0.0002	0.05	0.004	0.01
	Losses	5 (3)	60	23 m	23 m	23 m						
	Gains	39 (27)	0	NR	NR	97 m						
Chromosome 11	Diploid	42 (76)	7	NR	NR	NR	0.3	0.6	0.2			
	Losses	0 (0)	0	NR	NR	NR						
	Gains	13 (24)	15	NR	NR	97 m						
Chromosome 14	Diploid	97 (65)	3	NR	NR	NR	0.001	0.03	0.04	0.06	0.5	0.4
	Losses	19 (13)	26	29 m	29 m	29 m						
	Gains	32 (22)	3	NR	NR	97 m						
Chromosome 15	Diploid	106 (71)	6	NR	NR	NR	0.8	0.6	0.6			
	Losses	0 (0)	0	NR	NR	NR						
	Gains	43 (29)	7	NR	NR	97 m						
Chromosome 17	Diploid	106 (71)	7	NR	NR	NR	0.8	0.9	0.7			
	Losses	1 (1)	0	NR	NR	NR						
	Gains	42 (28)	5	NR	NR	97 m						
Chromosome 18	Diploid	66 (67)	6	NR	NR	84 m	0.005	0.06	0.08	0.05	0.9	0.8
	Losses	5 (5)	40	23 m	23 m	29 m						
	Gains	28 (28)	0	NR	NR	NR						
Chromosome 22	Diploid	59 (40)	5	NR	NR	98 m	0.6	0.7	0.8			
	Losses	82 (55)	6	NR	NR	NR						
	Gains	8 (5)	13	29 m	29 m	NR						
Chromosome X	Diploid	103 (70)	7	NR	NR	NR	0.7	0.7	0.9			
	Losses	17 (12)	6	NR	NR	97 m						
	Gains	27 (18)	4	NR	NR	NR						
Chromosome Y	Diploid	26 (58)	9	NR	NR	84 m	0.9	0.7	0.8			
	Losses	9 (20)	12	NR	NR	NR						
	Gains	10 (22)	11	NR	38 m	38 m						
No. of tumor cell clones	1 clone	67 (45)	4	NR	NR	NR	0.3	0.5	0.6			
	≥2 clones	82 (55)	8	NR	NR	97 m						

(continued)

Table 2. Prognostic impact of the cytogenetic characteristics of histologically benign/grade I meningiomas on early recurrence-free survival ($n = 149$) (continued)

Variable	Group	No. Patients (%)	% Recurrences from Total Cases	Prognostic Factors for Recurrence-Free Survival								
				75% Recurrence-Free Survival			Univariate Analysis (p Value)			Multivariate Analysis (p Value)		
				30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m
Karyotype of the ancestral tumor cell clone	Diploid	50 (36)	0	NR	NR	NR	<0.0001	0.0003	<0.0001	0.001	0.04	0.02
	-22	42 (28)	0	NR	NR	NR						
	-1p/-14q	11 (7)	46	23 m	24 m	24 m						
	Chromosome losses other than -22 and -1p/-14q	28 (18)	7	NR	NR	NR						
	Chromosome gains	18 (11)	11	NR	NR	NR						

Abbreviations: NR, not reached; m, months.

netic abnormalities involving losses of chromosomes 10 and 18 together with tumor location showed a predictive value close to statistical significance ($p \geq 0.05$ and ≤ 0.1).

Discussion

Until now, reports about the prognosis of meningioma patients have mainly focused on the 5- to 10-year RFS. From a practical point of view, this does not favor the use of prognostic scoring systems established already at diagnosis to help in deciding on closer follow-up of those patients at a higher risk of relapse after relatively long remission periods (e.g., 5–10 years). Because of this, in practice, a closer follow-up of meningioma patients who underwent curative surgery is frequently restricted to histologically atypical and anaplastic tumors.^{14,35,37,38} Despite this, it is well known that, in absolute numbers, most relapses occurring in meningioma patients correspond to histologically benign/grade I tumors,^{19,39–41} as also found in our series, where 20 of 27 recurrent tumors corresponded to histologically benign/grade I meningiomas (data not shown). Previous studies have shown that the use of specific cytogenetic markers such as del(1p36) and monosomy 14, either in the whole tumor cell population including the ancestral tumor cell clone or in some tumor cells, in combination with tumor size and age, is of great help in the prognostic stratification of histologically benign/grade I meningiomas.^{15,21–31} However, little information exists about the prognostic factors for predicting early relapses among histologically benign/grade I tumors. In the present study, we searched for the best combination of prognostic factors for predicting early relapses among histologically benign/grade I meningiomas. RFS at 2.5 years was chosen as an end point of interest since during this early period around

half of all relapses occurred, their frequency clearly decreasing thereafter. We have previously shown that age together with monosomy 14 was the best combination of variables for predicting RFS in histologically benign meningiomas after a median follow-up of more than 5 years.¹⁵ Further studies from our group and others indicate that tumor size could also be of additional prognostic value in this regard. In the present study, monosomy 14 and tumor size showed a significant association with the occurrence of early relapses in histologically benign/grade I meningiomas, while age appeared to be informative only after longer follow-up periods. Other clinical and cytogenetic variables showing a prognostic impact on the 30-month RFS included patient gender, tumor location and size, del(1p36), and losses of chromosomes 9, 10, and 18. In fact, all these clinical and cytogenetic variables have been identified as potentially associated with RFS once histologically benign and malignant meningiomas are considered together.^{10,16,23,24,29,42–44}

Until now, it has been well established that meningiomas are cytogenetically heterogeneous tumors both at the inter- and intratumoral cell level.^{45–49} In recent years, multicolor iFISH approaches have been systematically applied to the study of large series of meningioma patients, as in the present study, and hypothetical models of intratumoral clonal evolution have been proposed based on the cytogenetically different tumor cell clones detected.⁵⁰ Despite this, no study has been reported so far in which the prognostic impact of the number of tumor cell clones, or the intratumoral pathways of clonal evolution, has been analyzed in histologically benign meningiomas. In the present study, we show that, while the number of cytogenetically identified clones in a tumor had no significant impact on predicting early RFS in histologically benign meningiomas, coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone was a power-

Table 3. Prognostic impact of the clinicobiological characteristics of histologically benign/grade I meningiomas on early recurrence-free survival (*n* = 149)

Variable	Group	No. Patients (%)	% Recurrences from Total Cases	Prognostic Factors for Recurrence-Free Survival								
				75% Recurrence-Free Survival			Univariate Analysis (<i>p</i> Value)			Multivariate Analysis (<i>p</i> Value)		
				30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m	30 m	60 m	120 m
Age (years)	<55	47 (32)	11	NR	NR	66 m	0.1	0.02	0.002		0.008	0.001
	≥55	102 (68)	4	NR	NR	NR						
Sex	Male	43 (29)	14	NR	NR	31 m	0.01	0.08	0.05	0.4	0.2	0.6
	Female	106 (71)	3	NR	NR	NR						
Tumor location	Convexity	36 (24)	8	NR	NR	97 m	0.05	0.2	0.1	0.5	0.7	0.9
	Parasagittal or tentorial	44 (29)	9	NR	NR	NR						
	Ventricular	3 (2)	43	23 m	23 m	23 m						
	Cranial base	51 (34)	2	NR	NR	41 m						
	Spinal	15 (10)	0	NR	NR	NR						
Histologic subtype	Meningotheliomatous	107 (78)	9	NR	NR	NR	0.2	0.2	0.3			
	Psammomatous	17 (12)	0	NR	NR	NR						
	Transitional	13 (9)	0	NR	NR	NR						
	Fibroblastic	2 (1)	0									
Tumor size	<30 mm	36 (24)	6	NR	NR	NR	<0.0001	0.004	0.003	0.008	0.01	0.003
	30–50 mm	64 (43)	10	NR	NR	98 m						
	>50 mm	49 (33)	25	NR	NR	97 m						
Simpson's grade	1	6 (4)	17	NR	NR	NR	0.4	0.7	0.3			
	2	52 (35)	4	NR	NR	NR						
	3	91 (61)	7	NR	NR	97 m						
DNA ploidy status	DNA diploid	126 (84)	5	NR	NR	NR	0.4	0.9	0.6			
	DNA aneuploid	23 (16)	9	NR	NR	84 m						
% S phase + G2M tumor cells	≤1	43 (29)	2	NR	NR	NR	0.8	0.8	0.8			
	>1	106 (71)	5	NR	NR	97 m						

Abbreviations: NR, not reached; m, months.

ful adverse prognostic factor for early relapses in these patients. In fact, together with tumor size, it represented the best combination of independent prognostic factors for the identification of a relatively small group of patients with an early relapse risk of around 45%, in contrast to a larger group of individuals that showed an extremely low frequency (2%) of recurrences during the first 2.5 years after diagnostic surgery. Interestingly, coexistence of monosomy 14 and del(1p36) in the ancestral tumor cell clone is not restricted to histologically benign/grade I meningiomas but is also observed at significantly higher frequencies among histologically atypical and anaplastic meningiomas (25% vs. 8% in the present series), supporting the more aggressive behavior of meningiomas carrying these cytogenetic features.

Until now, several genes have been identified at chromosome 1p32 to 1p36 that could help to explain the more aggressive behavior of meningioma tumors carrying del(1p36), including the *COKN2C* (*p18^{INK4C}*), *p73*, *RAD45L*, and alkaline phosphatase genes.^{51–53} Despite this, the potential role of these genes as tumor suppressor genes in the pathogenesis of meningiomas remains unknown. In turn, regarding chromosome 14, no tumor suppressor genes have been clearly identified as potentially involved in determining the clinical behavior of meningiomas, either at the most frequently deleted regions (from 14q21 to 14q32) or at other parts of chromosome 14.^{54,55} However, Lusis et al.⁵⁶ recently suggested that the *NDRG2* gene localized at 14q11.2 could be involved in tumor progression since it is under-

expressed in anaplastic meningiomas due to methylation. In addition, it should be noted that recent results³⁶ based on both cytogenetic and histological data indicate that development of recurrent meningiomas after complete tumor resection could be frequently due to regrowth of the primary tumor and rarely associated with emergence of an unrelated meningioma. In line with this, in the present study, all recurrent tumors displayed histological behavior identical to that of their corresponding diagnostic meningiomas.

Altogether, these results indicate that, independent of the genes involved, coexistence of del(1p36) and monosomy 14 confers a unique pattern of tissue involvement and/or clonogenic potential to those histologically benign/grade I meningiomas carrying both abnormalities in their ancestral tumor cell clone. Interestingly, this does not appear to be related to the proliferative index of meningioma tumor cells since the percentage of S phase or S + G2 phase cells did not demonstrate a significant prognostic impact at any of the RFS end points analyzed. However, due to the low number of relapses occurring in the first 2.5 years after surgery ($n = 9$), our results require further confirmation in a longer series of histologically benign/grade I meningiomas.

In summary, in the present study, we show that histologically benign/grade I meningiomas displaying a large tumor size and carrying both monosomy 14 and del(1p36) in their ancestral tumor cell clone have a high probability of relapsing during the first 2.5 years after diagnostic surgery, and they should be followed more closely and/or treated differently from the other cases.

Acknowledgments

This work was partially supported by grant FIS 02/0010 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias and RETICC RD06/0020/0035 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain; grants HUS2/03, SA02/02, HUS05A06, and 44-05 from the Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain; Fundación MMA, Madrid, Spain; Ministerio de Ciencia y Tecnología, Programa Ramón y Cajal, Madrid, Spain, and IECSCYL (M.D.T.); and grants F105/00266 (A.B.E.) and CP05/00321 (J.M.S.) from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain.

References

1. 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.
2. Hsu DW, Efid JT, Hedley-Whyte ET. MIB-1 (Ki-67) index and transforming growth factor-alpha (TGF alpha) immunoreactivity are significant prognostic predictors for meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1998;24:441–452.
3. Maes L, Kalala JP, Cornelissen M, de Ridder L. PCNA, Ki-67 and hTERT in residual benign meningiomas. *In Vivo*. 2006;20:271–275.
4. 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.
5. 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.
6. Ayerbe J, Lobato RD, de la Cruz J, et al. Risk factors predicting recurrence in patients operated on for intracranial meningioma. A multivariate analysis. *Acta Neurochir (Wien)*. 1999;141:921–932.
7. Baird M, Gallagher PJ. Recurrent intracranial and spinal meningiomas: clinical and histological features. *Clin Neuropathol*. 1989;8:41–44.
8. 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. *Clin Neuropathol*. 2000;19:259–267.
9. Chan RC, Thompson GB. Morbidity, mortality, and quality of life following surgery for intracranial meningiomas. A retrospective study in 257 cases. *J Neurosurg*. 1984;60:52–60.
10. Christensen D, Laursen H, Klinken L. Prediction of recurrence in meningiomas after surgical treatment. A quantitative approach. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1983;61:130–134.
11. Hilbig A, Barbosa-Coutinho LM. Meningiomas. Histopathological aspects and recurrence. *Arq Neuropsiquiatr*. 1997;55:431–437.
12. Jan M, Bazeze V, Saudeau D, Autret A, Bertrand P, Gouaze A. Outcome of intracranial meningioma in adults. Retrospective study of a medicosurgical series of 161 meningiomas. *Neurochirurgie*. 1986;32:129–134.
13. Mahmood A, Qureshi NH, Malik GM. Intracranial meningiomas: analysis of recurrence after surgical treatment. *Acta Neurochir (Wien)*. 1994;126:53–58.
14. 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.
15. Maillo A, Orfao A, Sayagues JM, 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.
16. Mathiesen T, Lindquist C, Kihlstrom L, Karlsson B. Recurrence of cranial base meningiomas. *Neurosurgery*. 1996;39:2–7.
17. McLean CA, Jolley D, Cukier E, Giles G, Gonzales MF. Atypical and malignant meningiomas: importance of micronecrosis as a prognostic indicator. *Histopathology*. 1993;23:349–353.
18. Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg*. 1985;62:18–24.
19. Simoca I, Olarescu AA, Jipescu I, Lisievici M. Postoperative outcome of intracranial meningiomas; long-term prognosis. *Rom J Neurol Psychiatry*. 1994;32:237–251.
20. Stafford SL, Perry A, Suman VJ, et al. Primarily resected meningiomas: outcome and prognostic factors in 581 Mayo Clinic patients, 1978 through 1988. *Mayo Clin Proc*. 1998;73:936–942.

21. Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, et al. Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;9:296–298.
22. 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.
23. 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.
24. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R, et al. Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;148:123–128.
25. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, et al. Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative “tumor progression” locus. *Oncogene*. 1997;14:611–616.
26. Muller P, Henn W, Niedermayer I, et al. Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res*. 1999;5:3569–3577.
27. 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.
28. Schneider BF, Shashi V, 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.
29. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, 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.
30. Taberner MD, Espinosa AB, Maillo A, et al. Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase in situ hybridization and comparative genomic hybridization in 124 meningiomas: correlation with clinical, histopathologic, and prognostic features. *Am J Clin Pathol*. 2005;123:744–751.
31. Tse JY, Ng HK, Lau KM, Lo KW, Poon WS, Huang DP. Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol*. 1997;28:779–785.
32. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61:215–225.
33. Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957;20:22–39.
34. Maillo A, Diaz P, Sayagues JM, et al. Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer*. 2001;92:377–385.
35. Sayagues JM, Taberner MD, Maillo 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.
36. Espinosa AB, Taberner MD, Maillo A, et al. The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse. *Clin Cancer Res*. 2006;12:772–780.
37. Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A. Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol*. 1986;25:233–242.
38. Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM. Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery*. 1993;33:955–963.
39. Adegbite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg*. 1983;58:51–56.
40. Borovich B, Doron Y, Braun J, et al. Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. Part 2: clinical and radiological aspects. *J Neurosurg*. 1986;65:168–171.
41. Yao YT. Clinicopathologic analysis of 615 cases of meningioma with special reference to recurrence. *J Formos Med Assoc*. 1994;93:145–152.
42. Gupta PK, Sastry Kolluri, VR, Das S, et al. Recurrences in meningioma after surgery. *Acta Neurochir (Wien)*. 1989;100:104–107.
43. Leone PE, Mendiola M, Alonso J, 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.
44. Montriwattchai P, Kasantikul V, Taecholarn C. Clinicopathological features predicting recurrence of intracranial meningiomas. *J Med Assoc Thai*. 1997;80:473–478.
45. 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.
46. Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP. The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol*. 1990;1:19–24.
47. Katsuyama J, Papenhausen PR, Herz F, Gazivoda P, Hirano A, Koss LG. Chromosome abnormalities in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;22:63–68.
48. Scholz M, Gottschalk J, Striepecke E, Firsching R, Harders A, Fuzesi L. Intratumorous heterogeneity of chromosome 10 and 17 in meningiomas using non-radioactive in situ hybridization. *J Neurosurg Sci*. 1996;40:17–23.
49. Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H, et al. Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas. A study of 189 tumors. *Ann Genet*. 1998;41:164–175.
50. Sayagues JM, Taberner MD, Maillo A, et al. Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn*. 2004;6:316–325.
51. Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, 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.
52. Leuraud P, Marie Y, Robin E, et al. Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neurooncol*. 2000;50:207–213.
53. Zhu J, Guo SZ, Beggs AH, et al. Microsatellite instability analysis of primary human brain tumors. *Oncogene*. 1996;12:1417–1423.
54. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, et al. NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene*. 1999;18:2231–2239.
55. Weber RG, Bostrom J, Wolter M, 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.
56. Lusi EA, Watson MA, Chicoine MR, 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.

3.3.- ARTÍCULO 3: El género de los pacientes con meningioma se asocia con diferentes patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica vinculada a los cromosomas sexuales.

OBJETIVO. En los meningiomas existe un claro predominio del sexo femenino, asociado a un comportamiento clínico diferente al observado en los varones. Durante muchos años se ha considerado que estas diferencias en la frecuencia y el comportamiento clínico de los meningiomas en hombres y mujeres podrían estar asociadas a factores hormonales; sin embargo, en la actualidad sigue existiendo una importante controversia a este respecto. En este trabajo nos propusimos analizar en detalle, y de forma comparativa, las características clínicas, histopatológicas, genéticas y pronósticas de mujeres y varones con meningiomas.

MÉTODOS. Para llevar a cabo nuestro objetivo, se analizaron un total de 53 pacientes varones y 111 mujeres con meningioma. En todos los casos se realizaron estudios de hibridación in situ fluorescente multicolor sobre núcleos interfásicos (iFISH) para la detección de alteraciones numéricas de 12 cromosomas distintos, incluidos los cromosomas X e Y. Además, en un subgrupo de 45 pacientes (12 varones y 33 mujeres) se analizó el perfil de expresión génica de las células tumorales a nivel de su ARNm, empleando el chip U133A de la casa comercial Affymetrix.

RESULTADOS. En términos generales, nuestros resultados mostraron la existencia de diferencias significativas en las características de los meningiomas de mujeres y varones. Así, los varones, además de presentar una mayor frecuencia de meningiomas intracraneales y tumores de mayor tamaño, mostraron una mayor tasa de

recidiva. A su vez, los varones presentaron patrones de anomalías cromosómicas diferentes de los observados en mujeres, con una mayor proporción de casos con del(1p36) y pérdidas cromosómicas, a excepción de la presencia aislada de monosomía 22; por su parte, las mujeres con meningioma mostraron un mayor número de ganancias cromosómicas y de casos con monosomía 22 aislada en el clon tumoral ancestral, siendo además las pérdidas de un cromosoma X exclusivas de los tumores femeninos. Desde el punto de vista pronóstico, las alteraciones de diferentes cromosomas mostraron distinto impacto en la supervivencia libre de recaída en hombres y mujeres. Finalmente, el análisis de los perfiles de expresión genómica de las células tumorales pusieron de manifiesto la expresión diferencial en ambos grupos de tumores de únicamente 8 genes (RPS4Y1, DDX3Y, JARID1D, DDX3X, EIF1AY, XIST, USP9Y y CYorf15B), estando todos ellos codificados en los cromosomas sexuales.

CONCLUSIONES. En conjunto, nuestros resultados muestran la existencia de diferentes patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica en meningiomas de pacientes varones y mujeres, que podrían contribuir a explicar el comportamiento clínico ligeramente diferente de este tipo de tumores en ambos sexos.

Patient Gender Is Associated with Distinct Patterns of Chromosomal Abnormalities and Sex Chromosome–Linked Gene-Expression Profiles in Meningiomas

MARÍA DOLORES TABERNERO,^a ANA BELÉN ESPINOSA,^a ANGEL MAILLO,^b OLINDA REBELO,^c JAIME FERNANDEZ VERA,^a JOSÉ MARÍA SAYAGUES,^d MARTA MERINO,^b PEDRO DIAZ,^b PABLO SOUSA,^b ALBERTO ORFAO^d

^aUnidad de Investigación, IECSCYL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ^bNeurosurgery Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ^cNeuropathology Service, Hospital da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal; ^dCentro de Investigación del Cáncer, Cytometry General Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

Key Words. Gender • iFISH • Chromosomal abnormalities • Meningioma • Gene expression • Microarrays

Disclosure: No potential conflicts of interest were reported by the authors, planners, reviewers, or staff managers of this article.

ABSTRACT

The female predominance of meningiomas has been established, but how this is affected by hormones is still under discussion. We analyzed the characteristics of meningiomas from male ($n = 53$) and female ($n = 111$) patients by interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH). In addition, in a subgroup of 45 (12 male and 33 female) patients, tumors were hybridized with the Affymetrix U133A chip. We show a higher frequency of larger tumors ($p = .01$) and intracranial meningiomas ($p = .04$) together with a higher relapse rate ($p = .03$) in male than in female patients. Male patients had a higher percentage of del(1p36) ($p < .001$), while loss of an X chromosome was restricted to tumors from female patients ($p = .008$). In turn, iFISH studies showed a higher frequency of chromosome losses, other than monosomy 22 alone, in meningiomas from male

patients ($p = .002$), while female patients displayed a higher frequency of chromosome gains ($p = .04$) or monosomy 22 alone ($p = .03$) in the ancestral tumor clone. Interestingly, individual chromosomal abnormalities had a distinct impact on the recurrence-free survival rate of male versus female patients. In turn, gene expression showed that eight genes (*RPS4Y1*, *DDX3Y*, *JARID1D*, *DDX3X*, *EIF1AY*, *XIST*, *USP9Y*, and *CYorf15B*) had significantly different expression patterns ($R^2 > 0.80$; $p < .05$) in tumors from male and female patients. In summary, we show the existence of different patterns of chromosome abnormalities and gene-expression profiles associated with patient gender, which could help to explain the slightly different clinical behavior of these two patient groups. *The Oncologist* 2007;12:1225–1236

INTRODUCTION

Meningiomas are neoplasias of cells from the meningeal coverings of the brain, most cases corresponding to histo-

logically benign tumors. The incidence of meningiomas in women is more than twice as high as it is in men [1–3]. In addition, it is well known that female patients have a higher

Correspondence: Maria Dolores Tabernero Redondo, M.D. Ph.D., Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58, 37007 Salamanca, Spain. Telephone: 923-29-12-30; Fax: 923-29-46-24; e-mail: taberner@usal.es Received June 4, 2007; accepted for publication July 25, 2007. ©AlphaMed Press 1083-7159/2007/\$30.00/0 doi: 10.1634/theoncologist.12-10-1225

frequency of spinal meningiomas and a slightly better clinical outcome than male patients [4–5]. More recently, it was also reported that meningioma tumors in female patients display characteristic cytogenetic patterns that include a lower frequency of monosomy 14 and a greater proportion of cases with numerical abnormalities of chromosomes 22 and X, while complex karyotypes are more frequently observed in male patients [6–13]. Among other cytogenetic abnormalities, losses of chromosome 14 [8], whether associated or not with del(1p36) [9], have been associated with lower recurrence-free survival (RFS) rates in meningioma patients independently of patient gender and tumor histopathology. In addition, gains of chromosomes 11, 15, and 22 and losses of chromosomes 10 and 18 have also been shown to have an impact on patient outcome, but they did not show independent prognostic value [8, 14].

For decades, gender-associated differences in the frequency and clinical behavior of meningiomas have been claimed to be most probably related to hormonal factors [15–20]. In line with this, previous reports have shown a higher growth rate of meningiomas during both pregnancy [21–23] and the luteal phase of the menstrual cycle [24], and an association has been observed between meningioma and breast cancer [25–27]. In addition, meningioma tumor cells frequently express progesterone receptors (PRs) [28–30] and, to a lesser extent, estrogen receptors (ERs) [31, 32] and androgen receptors (ARs) [33] as well; PR expression has been correlated with disease outcome [15, 16, 28–30, 34, 35], and progesterone has been shown to modulate the *in vitro* growth of meningioma cells [36], although modest results were observed after treatment of meningioma patients [37, 38]. Despite these findings, the exact causes and mechanisms leading to the female predominance of meningioma still remain poorly understood; moreover, recent studies [33] failed to detect different patterns of expression of hormone receptors, including PR, ER, and AR, between male and female patients with meningioma tumors. Therefore, the role of sex hormones in determining female predominance in meningioma could involve more complex mechanisms, or alternatively, they could just have a marginal impact. Despite these observations, no study has been reported so far in which the genetic and genomic differences between male and female meningioma patients have been systematically analyzed in a large series of patients.

In the present study, we explored the clinical, histopathological, genetic, and prognostic differences between 53 male and 111 female meningioma patients; in addition, in a subgroup of 45 of these patients, we compared the patterns of gene expression between tumors from male and female patients. Our results show that, in addition to a higher frequency of spinal tumors and smaller meningiomas, fe-

male patients also display different patterns of chromosomal abnormalities than male patients, with many of the genetic changes observed showing a distinct impact on RFS in each of the two patient groups. Moreover, male and female meningioma patients had different patterns of gene expression, which were restricted to a few genes coded in the X and Y chromosomes.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study included 164 patients diagnosed with meningioma at the Neurosurgical Service of the University Hospital of Salamanca. Fifty-three (32%) were men and 111 (68%) were women, with a mean age \pm standard deviation (SD) of 59 ± 15 years (range, 13–84 years). All except three cases underwent complete tumor resection of Simpson's grade ≤ 3 tumors [39]. Tumor diagnosis and classification were performed according to World Health Organization criteria [40]. Histologically, most tumors (91%) were classified as grade I; 8% were grade II (atypical) and 1% were grade III (anaplastic) meningiomas. The distribution of patients according to tumor location and size, as well as the frequency of cases with multifocal meningiomas are summarized in Table 1. Some (39%) of the patients included in this study were also included in a previous report from our group [8].

Follow-up controls for the early detection of relapse included, apart from routine clinical and biological parameters, neuroimaging analysis using axial computerized tomography and magnetic resonance imaging studies. At the close of this study, 26 patients had relapsed and 138 remained disease free; the median RFS and overall survival times for the whole series were 71 months (range, 7–242 months) and 81 months (range, 1–369 months), respectively. None of the patients received adjuvant radiotherapy or chemotherapy after diagnosis and prior to an eventual relapse.

The study was approved by the institutional review board, and human investigations were performed after approval by the local ethical committee. Informed consent was obtained from each subject entering the study.

Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Studies

In all patients, interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) studies were performed on freshly frozen tumor samples obtained at diagnostic surgery according to techniques that have been previously described in detail elsewhere [41]. The presence of numerical abnormalities of chromosomes 1, 7, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 22, X, and Y was systematically investigated with the following com-

Table 1. Clinical and biological characteristics of male versus female meningioma patients

	Male patients, <i>n</i> = 53 (32%)	Female patients, <i>n</i> = 111 (68%)	<i>p</i> -value
Mean age (\pm SD), years	55 \pm 18	60 \pm 14	NS
Tumor location, <i>n</i> (%)			
Intracranial ^a	52 (98%)	97 (87%)	.04
Spinal	1 (2%)	14 (13%)	
Multifocal tumors, <i>n</i> (%)	1 (2%)	11 (10%)	NS
Tumor size (>40 mm), <i>n</i> (%)	39 (77%)	60 (57%)	.01
Tumor grade (WHO), <i>n</i> (%)			
Grade I	45 (85%)	104 (94%)	.07
Grade II and III	8 (15%)	7 (6%)	
Tumor histology, <i>n</i> (%)			
Meningothelial	39 (74%)	78 (70%)	NS
Fibroblastic	0 (0%)	1 (1%)	
Transitional	4 (7%)	11 (10%)	
Psammomatous	2 (4%)	14 (13%)	
Atypical	6 (11%)	7 (6%)	
Anaplastic	2 (4%)	0 (0%)	
Relapses, <i>n</i> (%)	13 (24%)	13 (12%)	.03
Deaths, <i>n</i> (%)	8 (15%)	7 (6%)	.08
75% RFS (months)	100	NR	.11

^aParasagittal/tentorial, convexity, cranial base/posterior fossa, and ventricular tumors were included as intracranial meningiomas.
Abbreviations: NR, not reached; NS, not significant (*p* > .05); RFS, recurrence-free survival; WHO, World Health Organization.

mercially available probes (all obtained from Vysis Inc., Downers Grove, IL, except the midisatellite 1p36 probe, which was purchased from Q-BIOgene Inc., Carlsbad, CA) in double-stainings: (a) LSI BCR/ABL dual color probe for chromosomes 9 and 22; (b) LSI PML/RAR- α dual color probe for chromosomes 15 and 17; (c) LSI IgH/CCD1 dual color probe for chromosomes 11 and 14; (d) CEP X DNA probe conjugated with Spectrum Orange (SO) and CEP Y DNA probe conjugated with Spectrum Green (SG) for chromosome X and Y; (e) CEP 7 DNA probe conjugated with SO and the LSI IgH/BCL2 dual color probe for chromosomes 7 and 18; and (f) the Midisatellite 1p36 probe and the CEP 10 DNA probe for chromosomes 1 and 10, respectively. The number of hybridization spots was evaluated using a BX60 fluorescence microscope (Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a 100 \times oil objective by counting at least 200 nuclei/slide. For all slides measured, the number of unhybridized cells in the areas assessed was irrelevant (<1%), and only those spots with a similar size, intensity, and shape were considered. The criteria used for the definition of the presence of numerical abnormalities for each individual chromosome as well as the criteria used

to define the ancestral tumor cell clone in each meningioma were based on an analysis of normal interphase nuclei and have been previously described in detail elsewhere [41, 42]. Briefly, for the definition of the ancestral tumor cell clone, we assumed that karyotypic abnormalities shared by all tumor cells represented the earliest changes, whereas latter cytogenetic alterations would only be present in a fraction of all tumor cells, representing more advanced tumor cell clones [42]. Accordingly, in those cases in which two or more tumor cell clones were present by iFISH, an ancestral tumoral cell clone could be identified as the one that carried only those karyotypic abnormalities common to all tumor cells.

RNA Extraction and Microarray Analyses of Gene Expression

For the comparison of gene-expression profiles, 45 meningioma tissue samples containing >60% tumor cells as evaluated by previously described methods [43] were homogenized using a Polytron PT10–35 homogenizer (Kinematica AG, Luzern, Switzerland). Total RNA was isolated in two steps using TRIzol (Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad, CA) and the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). The integrity and purity of the RNA were determined using a microfluidic electrophoretic system (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). RNA samples were then hybridized using the Human Genome U133A Chip (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical Methods

For all continuous variables included in the present study, the median, mean, SD, and range were calculated; for categorical variables, frequencies were used. To establish the statistical significance of the differences observed between groups, Mann-Whitney U and χ^2 tests were used for continuous and categorical variables, respectively. RFS curves were plotted according to the method of Kaplan and Meier, and a one-sided log-rank test was used to establish the statistical significance of the differences observed between curves. Statistical significance was considered to be present when the p -values obtained were <0.05 . A multivariate analysis of prognostic factors for RFS was performed using the Cox stepwise regression model. In this part of the study, gender, histopathology, and those variables showing a significant association with RFS in the univariate analyses of prognostic factors were considered simultaneously. For all statistical analyses listed above, the SPSS 12.0 software package (SPSS Inc, Chicago, IL) was used.

For the analysis of the results of microarray studies, data files containing information about gene expression for the 45 Affymetrix high-density oligonucleotide arrays/tumors analyzed were normalized using the Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) and R (version 2.3.0; <http://www.r-project.org>) software programs. Nonbiological background variation was removed using robust microarray normalization (RMA-preprocessing) [44]. For the identification of differentially expressed genes between tumors from male and female patients, the nearest shrunken centroids (Prediction Analysis of Microarrays software version 2.1; Tibshirani Lab, Department of Statistics, University of Stanford, Stanford, CA [45]), multivariate permutation (Significance Analysis of Microarrays software version 2.23 [46]), and Pearson correlation tests were used. Only those probes showing both a coefficient of correlation >0.80 and an adjusted p -value (as assessed by the Bonferroni test) <0.05 were considered to be differentially expressed in tumors from male and female patients.

Supervised hierarchical clustering analysis based on the average linkage method and the use of Euclidean distances was performed with Gene Cluster 3.0 software (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>) [47] to classify tumors from male and female patients according to the patterns of dif-



Figure 1. Age distribution of meningioma tumors according to gender.

ferentially expressed genes between the two gender-associated tumor groups. The resulting cluster was graphically represented using the Java TreeView 1.0.13 software, which can be freely downloaded from <http://jtreeview.sourceforge.net> [48].

RESULTS

From a clinicobiological point of view, male patients had a significantly higher frequency of larger (>40 mm) tumors ($p = .01$) and intracranial meningiomas ($p = .04$) and a higher relapse rate ($p = .03$) associated with a slightly lower RFS rate ($p = .11$), in comparison with female patients (Table 1). In turn, no statistically significant differences were found between male and female meningioma patients regarding the frequency of multifocal tumors, tumor histology and grade, and the patients' overall mean age (Table 1); despite this, a significant predominance of female patients was observed from age 50 onward ($p = .01$) (Fig. 1).

Regarding the frequency of numerical abnormalities detected for each chromosome analyzed, a significantly higher percentage of cases with del(1p36) was observed among male patients (48% versus 16%; $p < .001$), whereas loss of chromosome X was restricted to female patients (14% versus 0%; $p = .008$) (Fig. 2A). Abnormalities of chromosome Y consisted of nulismy Y and were detected in around one quarter of all male patients (26%). No statistically significant differences were detected between the patient groups for the other chromosomes analyzed (Fig. 2A). In turn, iFISH studies showed the presence of a single tumor cell clone in 67 of the 164 cases analyzed (41%), with similar frequencies in male (38%) and female (42%) patients. The remaining cases showed two to five coexisting tumor cell clones, with no significant difference in the mean number of clones per tumor detected in male versus female patients (mean number of clones per tumor, 2 ± 1 versus

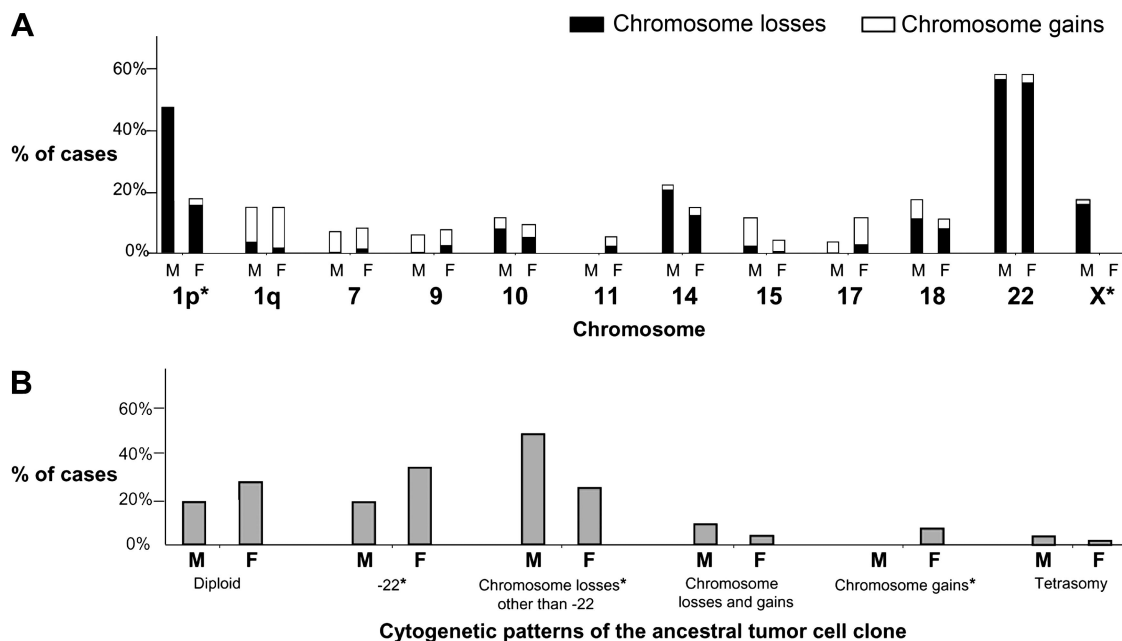


Figure 2. Frequency of losses and gains of individual chromosomes in meningioma tumors grouped according to patient gender. **(A):** Frequency of cases displaying abnormalities for each individual chromosome as analyzed in male and female patients. **(B):** The frequency of cases with different patterns of chromosomal aberrations in the ancestral tumor cell clone is displayed for both patient groups.

*Male versus female patients, $p < .05$.

M, male patients; F, female patients.

2 ± 1 ; $p > .05$). Nevertheless, a more careful analysis of the cytogenetic patterns of the ancestral tumor cell clone showed statistically significant differences between male and female meningioma patients (Fig. 2B). Accordingly, the ancestral tumor cell clone of male meningioma patients more frequently showed one or more chromosome loss other than monosomy 22 alone ($p = .002$), whereas female patients had a higher frequency of cases carrying chromosome gains ($p = .04$) and monosomy 22 in the absence of other abnormalities ($p = .03$) in the ancestral tumor cell clone.

From a prognostic point of view, abnormalities of chromosomes 9, 14, and 22 had a significant impact on RFS in both groups of patients ($p \leq .008$) (Fig. 3). However, a more detailed analysis of the impact of the abnormalities of these chromosomes on patient outcome showed that, while gain of chromosome 22 was associated with a lower RFS rate in both groups of patients, gain of chromosome 9 and monosomy 14 were associated with a worse prognosis in male patients, whereas loss of chromosome 9 and gain of chromosome 14 were related to a worse clinical outcome in female patients. In addition, losses of chromosomes 10 ($p = .009$) and 18 ($p = .0007$) were associated with a poor outcome in male but not in female patients, whereas gains of chromosomes 1q ($p = .008$), 7 ($p = .005$), and X ($p = .001$) had an adverse prognostic impact for female but not for

male patients (Fig. 3). Multivariate analysis of prognostic factors showed that, in the whole patient series, loss of chromosome 14 ($p = .02$) together with tumor size >40 mm ($p = .001$) was the best combination of independent variables for predicting RFS. However, while in male patients loss of chromosome 14 ($p = .02$) and gain of chromosome 22 ($p = .01$) represented the best combination of independent parameters for predicting RFS, in female patients loss of chromosome 9 was the only independent prognostic factor ($p = .001$).

Analysis of the patterns of gene expression by oligonucleotide-based microarrays in a group of 45 meningiomas (Table 2) showed that only eight genes had a significantly different expression pattern in male versus female patients. All these genes are coded in the sex chromosomes: two in chromosome X and six in chromosome Y (Table 3 and Fig. 4). Those genes localized to chromosome X included the *XIST* gene, which was exclusively expressed in those female patients with two or more X chromosomes, and the deadbox polypeptide 3 X-linked gene (*DDX3X*), involved in the transportation of nucleic acids, whose expression was greater in male than in female meningioma patients. Chromosome Y-linked genes expressed in greater amounts in male than in female meningioma patients included the *RPS4Y1*, *DDX3Y*, *JARID1D*, *EIF1AY*, *USP9Y*, and *CYorf15B* genes. Hierarchical clustering analysis showed

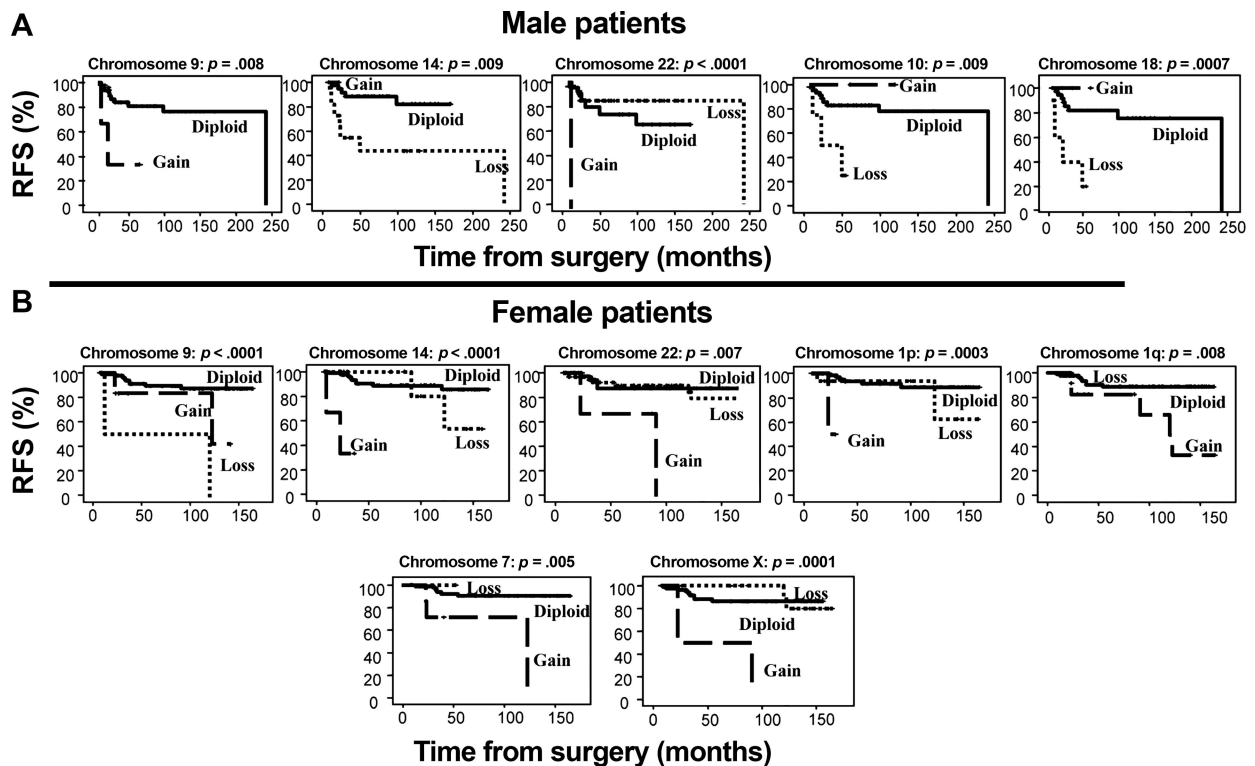


Figure 3. Impact of individual chromosomal abnormalities on recurrence-free survival (RFS) in male (A) and female (B) meningioma patients. For both groups of patients, the RFS curves are shown only for those chromosomal abnormalities displaying a statistically significant impact on patient outcome (RFS).

that, based on the expression of these genes, meningiomas from male patients could be clearly classified as different from those of female patients, except for the single male case with nulismy Y. Interestingly, this patient was classified together with female patients showing monosomy X in a subgroup of female-associated tumors (Fig. 5). No statistically significant differences were observed between meningiomas from male and female patients regarding the expression of genes encoding sex hormone receptors, including *PR*, *ER*, and *AR*, or other PR- and ER-related genes (e.g., progesterone receptor membrane component 1 and 2 [*PGRMC1* and *PGRMC2*], estrogen receptor binding site-associated antigen 9 [*EBAG9*], estrogen-related receptor beta like 1 [*ESRRBL1*], and estrogen-related receptor gamma [*ESRRG*], among others). Similarly, no statistically significant differences were observed in the patterns of gene expression between females younger and those older than 50 years for those genes encoding sex hormone receptors and their regulatory proteins included in the Human Genome U133A Affymetrix chip used in this study.

DISCUSSION

In the present study, we show the occurrence of unique patterns of cytogenetic abnormalities and gene-expression profiles in meningioma tumors from male and fe-

male patients. Interestingly, none of the differentially expressed genes in male versus female patients appeared to be directly related to the expression and/or regulation of the expression of sex hormones and their receptors. Similarly, they did not reflect differences in the frequency of the distinct autosomal chromosome abnormalities observed between male and female meningioma patients. In contrast, all differentially expressed genes were coded in the sex chromosomes, particularly in chromosome Y. Together, these findings support the involvement of nonsteroid hormone-associated genetic factors coded in the sex chromosomes in the development of the disease, indicating that female predominance could be potentially associated with one or more sex chromosome-coded genes. In addition, they also suggest that the reported differences in the frequency of specific abnormalities involving autosomal chromosomes could be related to sex chromosome-inherited differences.

So far, attempts aimed at the identification of different patterns of expression of individual sex hormone-associated proteins, such as PR, in male versus female meningioma patients have failed [16, 29, 33]. However, such studies have usually been based on the analysis of a restricted number of proteins, none of which is coded in the sex chromosomes. In the present study, only eight

Table 2. Relevant clinical, histopathological, and genetic characteristics of the 45 meningioma tumors in which the patterns of gene expression were analyzed by DNA oligonucleotide microarrays

Patient code	Gender	Age (years)	Tumor grade	Histological subtype (WHO)	Cytogenetic abnormalities ^a	Relapse
1	M	56	I	Transitional	Diploid	No
2	M	65	II	Atypical	Diploid	Yes
3	M	77	I	Transitional	Diploid	No
4	M	54	I	Transitional	Diploid	No
5	M	65	II	Atypical	Diploid	No
6	M	76	I	Transitional	-(22)	No
7	M	54	I	Psammomatous	-(22)	No
8	M	66	I	Fibroblastic	-(1p)	No
9	M	23	II	Atypical	-(1p,14,22, Y)+(15,18)	No
10	M	73	I	Meningothelial	-(1p,22)/TT	Yes
11	M	75	I	Transitional	-(1p,22)	Yes
12	M	41	II	Atypical	-(1p,14,22)+(1q)	Yes
13	F	62	II	Atypical	Diploid	No
14	F	62	II	Atypical	Diploid	No
15	F	76	I	Transitional	Diploid	No
16	F	73	I	Transitional	Diploid	No
17	F	68	I	Transitional	Diploid	No
18	F	63	I	Psammomatous	Diploid	No
19	F	84	I	Secretor	Diploid	No
20	F	36	I	Transitional	Diploid	No
21	F	68	I	Transitional	Diploid	No
22	F	69	I	Meningothelial	Diploid	No
23	F	47	I	Meningothelial	Diploid	No
24	F	54	II	Atypical	Diploid	No
25	F	72	I	Psammomatous	-(22)	No
26	F	59	I	Psammomatous	-(22)	No
27	F	81	I	Psammomatous	-(22)	No
28	F	54	I	Psammomatous	-(22)	No
29	F	74	II	Atypical	-(22)	No
30	F	34	I	Fibroblastic	-(22)	No
31	F	76	I	Fibroblastic	-(22)/TT	Yes
32	F	77	I	Transitional	-(22)/TT	No
33	F	65	I	Psammomatous	-(22)/TT	No
34	F	53	I	Fibroblastic	-(22)/TT	No
35	F	73	I	Meningothelial	-(1p)/TT	No
36	F	68	I	Psammomatous	-(1p)/TT	No
37	F	80	I	Meningothelial	-(1p)/TT	No
38	F	64	II	Atypical	-(1p,11,18,22)+(1q,7,17)	No
39	F	30	II	Atypical	-(14)+(22,X)++(1q)/ 1qA	Yes
40	F	35	II	Atypical	-(14)+(1,7,10,15,17,Y)++(18)/TT	No
41	F	76	I	Meningothelial	-(14,22,X)	No
42	F	60	I	Transitional	-(1p,14,22)+(9)	Yes

(continued)

Table 2. (Continued)

Patient code	Gender	Age (years)	Tumor grade	Histological subtype (WHO)	Cytogenetic abnormalities ^a	Relapse
43	F	52	II	Atypical	-(1p,10,14,15,17,18,22,X)/TT	No
44	F	70	I	Transitional	-(1p,14,22,X)/1qA+(1q)/TT	No
45	F	30	III	Anaplastic	-(14)+(22,X,1q)	Yes

^aCytogenetic nomenclature for iFISH according to the International System for Human Cytogenetic nomenclature (ISCN) 1995: Diploid in female: nuc ish Xcen(DXZ1×2), 1p36(D1Z2×2), 1cen(D1Z5×2), 7cen(D7Z1×2), 9q34(ABL×2), 10cen(D10Z1×2), 11q13(CCND1×2), 14q32.3(IGH×2), 15q22(PML×2), 17q12-q21(RARA×2), 18q21(BCL2×2), 22q11.2(BCR×2).
Diploid in male: nuc ish Xcen(DXZ1×1), Ycen(DYZ3×1), 1p36(D1Z2×2), 1cen(D1Z5×2), 7cen(D7Z1×2), 9q34(ABL×2), 10cen(D10Z1×2), 11q13(CCND1×2), 14q32.3(IGH×2), 15q22(PML×2), 17q12-q21(RARA×2), 18q21(BCL2×2), 22q11.2(BCR×2).
Triploid in female: nuc ish Xcen(DXZ1×3), 1p36(D1Z2×3), 1cen(D1Z5×3), 7cen(D7Z1×3), 9q34(ABL×3), 10cen(D10Z1×3), 11q13(CCND1×3), 14q32.3(IGH×3), 15q22(PML×3), 17q12-q21(RARA×3), 18q21(BCL2×3), 22q11.2(BCR×3).
Losses: -1p: nuc ish 1p36(D1Z2×1); -1q: nuc ish 1cen(D1Z5×1); -9: nuc ish 9q34(ABL×1); -10: nuc ish 10cen(D10Z1×1); -14: nuc ish 14q32.3(IGH×1); -18: nuc ish 18q21(BCL2×1); -22: nuc ish 22q11.2(BCR×1); -X: nuc ish Xcen(DXZ1×1); -Y: nuc ish Ycen(DYZ3-); +1q: nuc ish 1cen(D1Z5×3); +7: nuc ish 7cen(D7Z1×3); +9: nuc ish 9q34(ABL×3); +14: nuc ish 14q32.3(IGH×3); +15: nuc ish 15q22(PML×3); +17: nuc ish 17q12-q21(RARA×3); +22: nuc ish 22q11.2(BCR×3); +X: nuc ish Xcen(DXZ1×3).

Table 3. Genes differentially expressed in male and female meningioma patients and their chromosomal location

Gene	Coded name	Chromosomal location	Correlation coefficient	p-value
Ribosomal protein S4, Y-linked 1	<i>RPS4Y1</i>	Yp11.3	0.97	<.0001
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	<i>DDX3Y</i>	Yq11	0.96	<.0001
Jumonji, AT rich interactive domain 1D	<i>JARID1D</i>	Yq11	0.92	<.0001
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	<i>DDX3X</i>	Xp11.3-p11.23	0.89	<.0001
Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	<i>EIF1AY</i>	Yq11.222	0.86	<.0001
X (inactive)-specific transcript	<i>XIST</i>	Xq13.2	-0.83	<.0001
Ubiquitin specific protease 9, Y-linked	<i>USP9Y</i>	Yq11.2	0.82	<.0001
Chromosome Y open reading frame 15B	<i>CYorf15B</i>	Yq11.222	0.82	<.0001

genes displayed a significantly different expression pattern in male versus female meningioma patients, and none of them was directly associated with expression of hormone receptors and genes involved in their regulation. In contrast, all eight genes were localized to the sex chromosomes: two in chromosome X (*DDX3X*, *XIST*) and six in chromosome Y (*RPS4Y1*, *DDX3Y*, *JARID1D*, *EIF1AY*, *USP9Y*, and *CYorf15B*). Interestingly, a third subgroup including both female patients with monosomy X and a male patient with nullosomy Y was clearly identified within the major cluster of tumors from female patients, based on the pattern of expression of these genes. A more detailed analysis of these eight genes suggests that some of them could be irrelevant in directly predisposing to the development of meningiomas. Accord-

ingly, *XIST* is an essential gene for the inactivation of one of the two X chromosomes in female mammalian cells, which transcriptionally silences one X chromosome [49]. In turn, the *USP9Y* gene is a member of the C19 peptidase family that encodes for a protein similar to ubiquitin-specific proteases, which cleaves the ubiquitin moiety from ubiquitin-fused precursors and ubiquitylated proteins [50]; mutations in *USP9Y* have been associated with Sertoli cell-only syndrome and male infertility [51]. In line with this limited evidence of both genes directly contributing to a female predominance in meningioma, *XIST* and *USP9Y* have been previously reported to be differentially expressed in normal human blood cells and mouse brain tissues from male versus female individuals [52–54]. In contrast, the exact role of

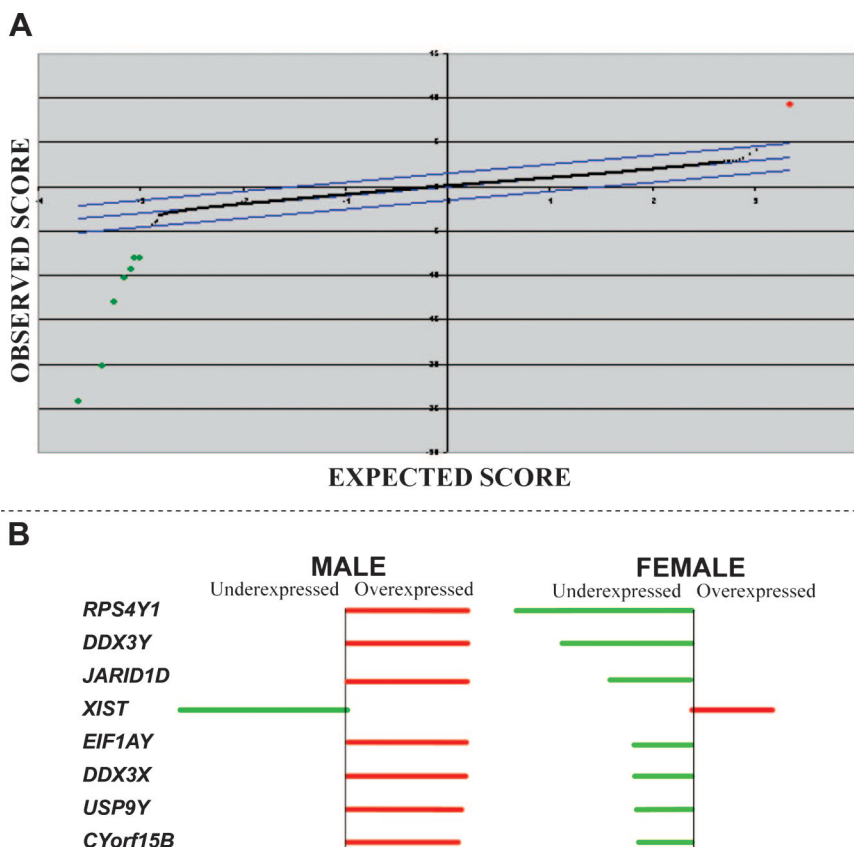


Figure 4. Comparison of the expected versus observed scores for the expression of the 12,847 genes analyzed using the U133-A oligonucleotide microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA) in female versus male meningioma patients. Genes showing a significantly different expression pattern in the two gender-associated groups ($n = 8$) are colored red and green (A). (B): The degree of differential expression in male versus female patients is shown for each of these eight individual genes.

the other six differentially expressed genes in determining the female predominance of meningioma remains to be elucidated. Interestingly, analysis of different Web-based freely accessible microarray gene-expression data sets from brain tissue [55], hematopoietic neoplastic cells from chronic lymphocytic leukemia [56], and renal cancer tissues [57] showed that, apart from the *DDX3Y* gene, the other genes are also differentially expressed in normal and/or neoplastic tissues from male versus female individuals in the first two data sets. In turn, no significant differences were observed in the expression patterns of these genes in normal somatic meningeal cell samples from the male ($n = 2$) and female ($n = 2$) individuals analyzed in this study (data not shown). The *DDX3Y* DEAD box protein and its homologue in the X chromosome (*DDX3X*) act as human RNA helicases and are localized close to the nuclear membrane pore, and are involved in exporting RNA outside the nucleus during embryogenesis, spermatogenesis, and both cellular growth and division [58]. Further investigations are necessary to elucidate the exact explanation for the associa-

tion between the expression of this gene and gender in meningioma patients.

In line with preliminary results from our [41, 42] and other [59–62] groups, gender was also associated with the presence of different cytogenetic abnormalities in the ancestral tumor cell clone in meningiomas. Accordingly, while ancestral tumor cell clones of female meningioma patients more frequently showed monosomy 22 alone and gains of individual chromosomes, tumors from male patients were frequently related to the presence of losses of chromosomes other than monosomy 22 and complex karyotypes including nullosomy Y, monosomy 14, and *del(1p36)* in the ancestral tumor cell clone. Together, these findings further support the existence of different cytogenetic pathways of clonal evolution in meningioma patients [42], providing increasing evidence for the involvement of gender in this process. Based on the type of chromosomal abnormalities detected at different frequencies in male versus female meningioma patients, including those identified in their ancestral tumor cell clones, it could be speculated that deletion of the *NF2*

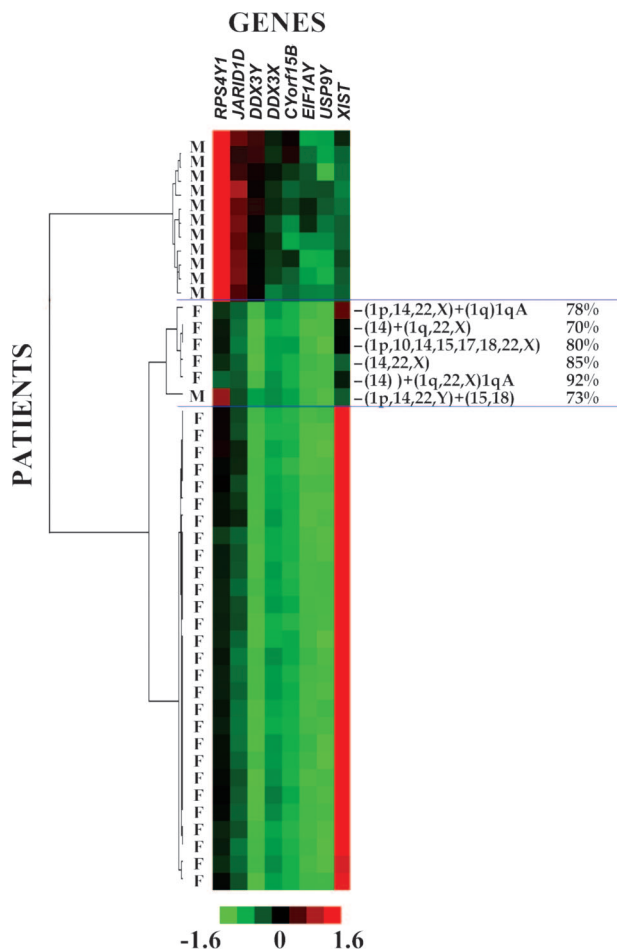


Figure 5. Hierarchical cluster analysis of genes differentially expressed in male and female meningioma patients. Results are organized in a gene-expression matrix format where each column represents a single gene (listed with the corresponding gene symbol) and each row represents a meningioma sample (those rows identified with an “M” correspond to male patients and those identified with an “F” correspond to female patients). Normalized values reflecting the abundance of mRNA are represented by a color scale where red reflects upregulated and green reflects downregulated gene expression. On the left side of the figure, the hierarchical clustering of samples obtained shows that tumors from the two classes (female and male patients) were classified separately, except for one tumor from a male patient that showed nullosomy Y in 73% of the neoplastic cells.

gene in chromosome 22 or dysregulation of oncogenes as a result of chromosome gains in a smaller proportion of cases could play a central role in tumor development in female patients, while tumor suppressor genes encoded in chromosomes other than chromosome 22 (e.g., genes coded in chromosomes 1p and 14, among others), alone or in combination with other tumor suppressor genes and/or oncogenes, could determine development and progression of meningiomas in male patients [63–67]. In line with this hypothesis, recent results [43] suggest that

spinal tumors, also found in the present series to be almost entirely restricted to female patients, show unique patterns of gene expression associated with the presence of monosomy 22 in the ancestral tumor cell clone. In addition, such differences could also help to explain the slightly higher frequency of grade II or III meningiomas and larger tumors among male patients. However, in the present study, no clear association was found between the patterns of gene expression in male and female patients that could be related to differences in autosomal chromosome gains or losses. This could be because of the fact that, on most occasions, monosomy 14 and del(1p36) are present in only a subset of all meningioma tumor cells [14, 42], and in the present study, the patterns of gene expression were analyzed for the overall tumor and not for specific tumor cell clones. Further studies are necessary to investigate the potential relationship between the differentially expressed genes reported here between the male and female patients and the distinct genetic abnormalities found in the two groups of patients.

From a prognostic point of view, abnormalities in chromosome 14 have been shown to be a relevant prognostic factor for predicting RFS in meningioma patients independently of patient gender and tumor histopathology [8–10], as also confirmed in the present study. Moreover, to the best of our knowledge, no study has been reported so far in which the prognostic value of tumor cytogenetics has been separately analyzed in male and female patients. In this regard, we found a worse clinical outcome for male patients displaying losses of chromosome 10, 14, and 18, while female patients with gains of chromosomes 1q, 7, 9, 22, and X had a lower RFS rate. Together, these observations further support the hypothesis that loss of different tumor suppressor genes could also be responsible for disease outcome in male patients, while RFS in female patients is mainly affected by gains of certain oncogenes, particularly those localized to chromosomes 1q, 7, 9, 22, and X. The different patterns of clonal evolution found in male and female meningioma patients did not show a clear impact on the patterns of gene expression between the two groups of meningioma patients, which could further help to explain the different prognostic impact observed for most individual chromosomal abnormalities in male versus female patients. In line with this, previous multivariate studies [8, 67] have failed to show independent prognostic value for patient gender and monosomy 14, the latter clearly showing a higher prognostic impact, as also confirmed in the present study. Interestingly, we further show here that monosomy 14 together with a gain of chromosome 22 is the best combination of independent

prognostic factors for RFS in male patients, while a gain of chromosome 9, but not the reported abnormalities in chromosomes 14 and 22, appear to be the most relevant prognostic factor in female patients.

In summary, in the present study, we show the existence of different patterns of chromosomal abnormalities and gene-expression profiles in male versus female meningioma patients, which could help to explain the slightly different clinical behavior between the two patient groups. The observations that differentially expressed genes in male versus female patients are coded in the sex chromosomes and they are not directly related to sex hormone receptors support the hypothesis that sex chromosome-associated genes are involved in the gender-associated

differences reported, although the exact role of hormonal factors remains unclear.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS/FEDER 02/0010 and RETICC RD06/0020/0035 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain), Consejería de Educación (HUS2/03, Junta de Castilla y León, Valladolid, Spain), and Fundación MMA (Madrid, Spain). M.D. Tabertero is supported by IECSCYL. A.B. Espinosa and J.M. Sayagues are supported by grants (FI05/00266 and CP05/00321, respectively) from the Ministerio de Sanidad y Consumo (Madrid, Spain).

REFERENCES

- Bondy M, Ligon BL. Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: A review. *J Neurooncol* 1996;29:197–205.
- Longstreth WT Jr, Dennis LK, McGuire VM et al. Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 1993;72:639–648.
- Lamszus K. Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:275–286.
- Levy WJ Jr, Bay J, Dohn D. Spinal cord meningioma. *J Neurosurg* 1982;57:804–812.
- Solero CL, Fornari M, Giombini S et al. Spinal meningiomas: Review of 174 operated cases. *Neurosurgery* 1989;25:153–160.
- Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H et al. Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas. A study of 189 tumors. *Ann Genet* 1998;41:164–175.
- Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M et al. Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: A study of 60 tumors. *Clin Neuropathol* 2000;19:259–267.
- Maillo A, Orfao A, Sayagues JM 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.
- Maillo A, Orfao A, Espinosa AB 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.
- Maillo A, Diaz P, Sayagues JM et al. Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer* 2001;92:377–385.
- Weber RG, Bostrom J, Wolter M 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.
- Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M et al. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 1990;50:5863–5867.
- Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E et al. Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995;54:224–235.
- Espinosa AB, Tabertero MD, Maillo A et al. The cytogenetic relationship between primary and recurrent meningiomas points to the need for new treatment strategies in cases at high risk of relapse. *Clin Cancer Res* 2006;12:772–780.
- Carroll RS, Brown M, Zhang J et al. Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:3570–3575.
- Hsu DW, Efid JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: Prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997;86:113–120.
- Bouillot P, Pellissier JF, Devicor B et al. Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptors, estrogen-regulated protein, and growth fraction: Immunocytochemical assays in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. *J Neurosurg* 1994;81:765–773.
- Wolfsberger S, Doostkam S, Boecher-Schwarz HG et al. Progesterone-receptor index in meningiomas: Correlation with clinico-pathological parameters and review of the literature. *Neurosurg Rev* 2004;27:238–245.
- Wahab M, Al-Azzawi F. Meningioma and hormonal influences. *Climacteric* 2003;6:285–292.
- Lee E, Grutsch J, Persky V et al. Association of meningioma with reproductive factors. *Int J Cancer* 2006;119:1152–1157.
- Smith JS, Quinones-Hinojosa A, Harmon-Smith M et al. Sex steroid and growth factor profile of a meningioma associated with pregnancy. *Can J Neurol Sci* 2005;32:122–127.
- Kanaan I, Jallu A, Kanaan H. Management strategy for meningioma in pregnancy: A clinical study. *Skull Base* 2003;13:197–203.
- Isla A, Alvarez F, Gonzalez A et al. Brain tumor and pregnancy. *Obstet Gynecol* 1997;89:19–23.
- 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.
- Custer BS, Koepsell TD, Mueller BA. The association between breast carcinoma and meningioma in women. *Cancer* 2002;94:1626–1635.
- Bonito D, Giarelli L, Falconieri G et al. Association of breast cancer and meningioma. Report of 12 new cases and review of the literature. *Pathol Res Pract* 1993;189:399–404.
- Kubo M, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S et al. Association of breast cancer with meningioma: Report of a case and review of the literature. *Jpn J Clin Oncol* 2001;31:510–513.

- 28 Roser F, Nakamura M, Ritz R et al. Proliferation and progesterone receptor status in benign meningiomas are not age dependent. *Cancer* 2005;104:598–601.
- 29 Carroll RS, Glowacka D, Dashner K et al. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993;53:1312–1316.
- 30 Verhagen A, Go KG, Visser GM et al. The presence of progesterone receptors in arachnoid granulations and in the lining of arachnoid cysts: Its relevance to expression of progesterone receptors in meningiomas. *Br J Neurosurg* 1995;9:47–50.
- 31 Carroll RS, Zhang J, Black PM. Expression of estrogen receptors alpha and beta in human meningiomas. *J Neurooncol* 1999;42:109–116.
- 32 Custer B, Longstreth WT Jr, Phillips LE et al. Hormonal exposures and the risk of intracranial meningioma in women: A population-based case-control study. *BMC Cancer* 2006;6:152.
- 33 Korhonen K, Salminen T, Raitanen J et al. Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J Neurooncol* 2006;80:1–7.
- 34 Roser F, Nakamura M, Bellinzona M et al. The prognostic value of progesterone receptor status in meningiomas. *J Clin Pathol* 2004;57:1033–1037.
- 35 Rubinstein AB, Loven D, Geier A et al. Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 1994;81:184–187.
- 36 Adams EF, Schrell UM, Fahlbusch R et al. Hormonal dependency of cerebral meningiomas. Part 2: In vitro effect of steroids, bromocriptine, and epidermal growth factor on growth of meningiomas. *J Neurosurg* 1990;73:750–755.
- 37 Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM et al. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J Neurosurg* 1991;74:861–866.
- 38 Lamberts SW, Tanghe HL, Avezaat CJ et al. Mifepristone (RU 486) treatment of meningiomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:486–490.
- 39 Simpson D. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20:22–39.
- 40 Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215–225; discussion 226–229.
- 41 Sayagues JM, Taberner MD, Maillou 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.
- 42 Sayagues JM, Taberner MD, Maillou A et al. Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): Is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn* 2004;6:316–325.
- 43 Sayagues JM, Taberner MD, Maillou A et al. Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: Different clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:445–454.
- 44 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003;4:249–264.
- 45 Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B et al. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6567–6572.
- 46 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116–5121.
- 47 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14863–14868.
- 48 Saldanha AJ. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004;20:3246–3248.
- 49 Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991;349:38–44.
- 50 Thomson R, Pritchard JK, Shen P et al. Recent common ancestry of human Y chromosomes: Evidence from DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7360–7365.
- 51 Foresta C, Ferlin A, Garolla A et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998;13:302–307.
- 52 Whitney AR, Diehn M, Popper SJ et al. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1896–1901.
- 53 Xu J, Burgoyne PS, Arnold AP. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum Mol Genet* 2002;11:1409–1419.
- 54 Tang Y, Lu A, Ran R et al. Human blood genomics: Distinct profiles for gender, age and neurofibromatosis type 1. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;132:155–167.
- 55 Vawter MP, Evans S, Choudary P et al. Gender-specific gene expression in post-mortem human brain: Localization to sex chromosomes. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:373–384.
- 56 Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004;22:3937–3949.
- 57 Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP et al. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003;3:31.
- 58 Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 1997;278:675–680.
- 59 Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA et al. BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002;111:393–405.
- 60 Benoit MH, Hudson TJ, Maire G et al. Global analysis of chromosome X gene expression in primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells and epithelial ovarian cancer cell lines. *Int J Oncol* 2007;30:5–17.
- 61 Piao Z, Malkhosyan SR. Frequent loss Xq25 on the inactive X chromosome in primary breast carcinomas is associated with tumor grade and axillary lymph node metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;33:262–269.
- 62 Lachlan KL, Youings S, Costa T et al. A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet* 2006;118:640–651.
- 63 Leone PE, Bello MJ, de Campos JM et al. NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 1999;18:2231–2239.
- 64 Lamszus K, Kluwe L, Matschke J et al. 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.
- 65 Murakami M, Hashimoto N, Takahashi Y et al. A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: Identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;140:99–106.
- 66 Lindblom A, Ruttledge M, Collins VP et al. Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 1994;56:354–357.
- 67 Logan JA, Seizinger BR, Atkins L et al. Loss of the Y chromosome in meningiomas. A molecular genetic approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;45:41–47.

3.4.- ARTÍCULO 4: Caracterización de las alteraciones del cromosoma 14 en 124 meningiomas empleando técnicas de hibridación in situ fluorescente e hibridación genómica comparada.

OBJETIVO. La pérdida del cromosoma 14 en meningiomas se ha asociado con un comportamiento más agresivo de la enfermedad; sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un análisis comparativo del pronóstico de los meningiomas con monosomía 14 frente a aquellos que presentan deleciones intersticiales de este cromosoma. El objetivo del presente trabajo se centró en la caracterización de las alteraciones citogenéticas asociadas a pérdidas de material genético del cromosoma 14 y su posible asociación con el comportamiento clínico-biológico de la enfermedad.

MÉTODOS. Para la identificación de las alteraciones del cromosoma 14 se analizaron un total de 124 pacientes con meningioma en los que se realizó técnica de hibridación in situ fluorescente sobre núcleos interfásicos (iFISH) empleando sondas centroméricas, teloméricas y específicas de locus de este cromosoma; al objeto de confirmar la naturaleza de las anomalías detectadas, los estudios anteriores se complementaron con análisis de hibridación genómica comparada (CGH) de los mismos tumores. Finalmente, las alteraciones genéticas encontradas en el cromosoma 14 se correlacionaron con las características clínicas, histopatológicas y el pronóstico de la enfermedad.

RESULTADOS. De los 124 casos analizados, 50 (40.3%) mostraron pérdida (14.5%) o ganancia (25.8%) de la región 14q32 del cromosoma 14 mediante iFISH. La mayoría de estas alteraciones correspondieron a monosomías (12.9%), trisomías (1.6%)

o tetrasomías (24.2%) del cromosoma 14; en tan solo 2 casos (1.6%), las pérdidas del cromosoma 14 no involucraron al cromosoma entero, sino que estaban restringidas a la región 14q31-q32, como se confirmó mediante CGH. Los meningiomas que presentaban ganancias o monosomías del cromosoma 14 correspondían con mayor frecuencia a tumores histológicamente malignos ($p= 0.009$). Asimismo, la presencia de monosomía 14/14q se asoció con el sexo masculino ($p= 0.04$), una mayor incidencia de recidiva ($p= 0.003$) y una menor supervivencia libre de enfermedad ($p= 0.03$). Los dos pacientes que mostraban deleciones intersticiales del brazo largo del cromosoma 14, correspondieron a tumores histológica y clínicamente benignos, sin que hubieran recidivado hasta el momento de cerrar el presente estudio, tras un seguimiento de más de 5 años.

CONCLUSIÓN. Nuestros resultados indican que la mayoría de las anomalías genéticas que se detectan en el cromosoma 14 de las células tumorales de pacientes con meningioma, son de tipo numérico, constituyendo las deleciones intersticiales a nivel de 14q31-q32 un hallazgo poco frecuente. De todas las alteraciones detectadas en el cromosoma 14, sólo la pérdida total o monosomía 14 mostró un impacto significativo sobre la supervivencia libre de recidiva, asociándose con un pronóstico adverso.

Characterization of Chromosome 14 Abnormalities by Interphase In Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization in 124 Meningiomas

Correlation With Clinical, Histopathologic, and Prognostic Features

María Dolores Tabernero, MD, PhD,^{1*} Ana Belén Espinosa,^{1*} Angel Maíllo, MD, PhD,² José María Sayagués,⁴ María del Carmen Alguero,¹ Eva Lumbreras,³ Pedro Díaz, MD,² Jesús María Gonçalves, MD, PhD,² Ignacio Onzain, MD,² Marta Merino, MD,² Francisco Morales, MD, PhD,² and Alberto Orfao, MD, PhD⁴

Key Words: Comparative genomic hybridization; CGH; Fluorescence in situ hybridization; FISH; Meningioma; Monosomy 14; Relapse-free survival

DOI: 10.1309/D7U997XD2PHBCQCN

Abstract

We analyzed quantitative chromosome 14 abnormalities in 124 meningiomas by interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH) and confirmed the nature of abnormalities by comparative genomic hybridization (CGH). We correlated the abnormalities with clinical, histopathologic, and prognostic factors.

Of 124 cases, 50 (40.3%) showed loss (14.5%) or gain (25.8%) of the 14q32 chromosome region by iFISH. Most corresponded to numeric abnormalities: monosomy (12.9%), trisomy (1.6%), or tetrasomy (24.2%); in only 2 cases (1.6%), chromosome 14 loss did not involve the whole chromosome and was restricted to the 14q31-q32 region (confirmed by CGH). Cases with gain or monosomy corresponded more frequently to histologically malignant tumors ($P = .009$). Patients with monosomy 14/14q-, but not those with gain, more often were male ($P = .04$) and had a greater incidence of recurrence ($P = .003$) and shorter relapse-free survival ($P = .03$). The 2 patients with loss limited to 14q31-q32 had histologically benign tumors and no relapse after more than 5 years' follow-up.

Most meningiomas with chromosome 14 abnormalities have numeric changes, with interstitial deletions of 14q31-q32 present in few cases. Of the abnormalities detected, only monosomy 14 showed an adverse prognostic impact.

In recent decades, an increasingly high number of studies devoted to the analysis of cytogenetic characteristics of meningiomas have been reported.¹⁻¹² Abnormalities of chromosomes 22, 1, 9, 10, 18, and 14 have been observed frequently. Since the first description in 1986 of the loss of chromosome 14 in meningiomas,⁷ several authors have used conventional cytogenetic techniques to study their incidence.^{3,12,13} However, conventional karyotyping has several limitations that might influence the results obtained. More recent studies¹³⁻¹⁸ in which interphase fluorescence in situ hybridization (iFISH), comparative genomic hybridization (CGH), and determination of loss of heterozygosity have been used confirmed the occurrence of abnormalities of chromosome 14 in 12% to 55% of the meningioma cases analyzed.¹⁸⁻²¹ In the vast majority of the studies, abnormalities consisted of monosomy 14, deletions in different areas of the long arm of chromosome 14, or structural rearrangements involving translocations of chromosome 14.

Loss of chromosome 14 in meningiomas has been associated with more aggressive behavior of the disease as reflected by a more advanced stage at diagnosis, higher tumor progression, and greater relapse rates.^{18,21-27} In a recent study based on a series of 70 consecutive meningiomas, Maíllo et al²¹ showed that loss of chromosome 14 was a powerful independent prognostic factor for predicting relapse-free survival, even within histopathologically benign tumors. Despite the association between loss of chromosome 14 and prognosis of the disease, no studies have attempted to define further the cytogenetic abnormality involved in this adverse prognostic impact. At present, the prognosis of meningiomas with monosomy 14 compared with those with interstitial deletions on 14q have not been analyzed in detail.

To better characterize the abnormalities associated with loss of genetic material from chromosome 14, we applied 4 iFISH probes and CGH to the study of chromosome 14 in a series of 124 patients with meningioma. A centromeric iFISH probe was used in combination with a telomeric probe for 14q to confirm the presence or absence of numeric abnormalities of chromosome 14 and subtelomeric 14q deletion. In addition, the existence of interstitial deletions at 14q32, a region that contains tumor suppressor genes commonly deleted in meningiomas, was explored through the use of 2 additional probes. Our ultimate goal was to correlate the type of chromosome 14 abnormality detected with the clinical and biologic features of the disease.

Materials and Methods

Cases

Data for 124 patients diagnosed with meningioma who underwent gross total resection at the Neurosurgical Service, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain, were analyzed. Of the patients, 44 (35.5%) were males and 80 (64.5%) were females, in accordance with the female predominance observed by others^{1,8,15,20}; the mean \pm SD age was 58 ± 15 years (range, 16-82 years). Patients were diagnosed with intracranial (n = 117 [94.4%]) or spinal (n = 7 [5.6%]) meningioma. Diagnosis and classification of meningiomas were established in all cases according to World Health Organization criteria.²⁸ Accordingly, the study cohort consisted of 111 benign (grade I; 89.5%), 12 atypical (grade II; 9.7%), and 1 anaplastic (grade III; 0.8%) meningiomas. Tumor location was distributed as follows: cranial base, including posterior fossa, 33.9%; cerebral convexity, 29.0%; parasagittal and tentorial, 29.0%; ventricular, 2.4%; and spinal cord, 5.6%.

At the end of the study period, the mean \pm SD follow-up after surgery was 80 ± 50 months with a median of 70 months (range, 1-246 months). Of the 124 cases analyzed, 21 (16.9%) of the patients had experienced recurrence, with a median relapse-free survival of 39 months (range, 7-208 months) and an overall median follow-up of 153 months (range, 48-246 months). Time of relapse was determined as the date at which tumor recurrence was confirmed by axial computed tomography and magnetic resonance studies.

Interphase FISH Analyses

FISH analyses were performed on thawed tumor samples after fixation in methanol/acetic acid (3/1, vol/vol). Briefly, fixed cells were dropped on the surface of glass slides. After air drying, slides were incubated in a pepsin solution at 37°C for 10 minutes; the enzymatic reaction was

stopped by washing the slides twice in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.0). Then, cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS (10 minutes at room temperature) and washed twice in PBS. Afterward, fixed cells were dehydrated sequentially in graded series of ethanol in water (70%, 90%, and 100%, vol/vol).

Analysis of chromosome 14 was performed using 4 probes specific for DNA sequences of chromosome 14: (1) the LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe labeled with SpectrumGreen (Vysis, Downers Grove, IL), which spans approximately 1.5 megabases and contains sequences complementary to the entire immunoglobulin heavy chain (*IgH*) locus, extending about 300 kilobases (kb) beyond its 3' end; (2) the LSI IGH/CCD1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Vysis), which contains 2 different probes labeled with SpectrumGreen and identifies 2 different sequences in chromosome 14: one hybridizes to a germline genomic target of approximately 450 kb centered in the LSI IGH constant region and the other, which is also approximately 450 kb, hybridizes to the telomeric portion of the *IgH* variable region; in germline DNA, there is a central region of approximately 450 kb between both targets; (3) the TelVysion 14q telomeric probe labeled with SpectrumOrange (Vysis), used for the identification of losses of the distal region of chromosome 14q, hybridizes to a 160-kb sequence of the telomeric region of chromosome 14; and (4) a centromeric probe for chromosome 14 (Chromosome 14, 22 satellite probe direct red D14Z1-D22Z1; Qbiogene, Carlsbad, CA). A schematic representation of the chromosome 14 regions identified by the 4 probes used is shown in **Figure 1**. In all cases, probes were diluted in cDenHyb-2 buffer (Insitus Biotechnologies, Albuquerque, NM) according to previously reported techniques.²⁹

The slides containing DNA from the cells and the probes were denatured at 75°C for 6 minutes and immediately hybridized overnight at 38°C in a HYBrite thermocycler (Vysis). The next day, slides were washed sequentially for 5 minutes at 46°C in 50% formamide in 2 \times saline sodium citrate (SSC) and in 2 \times SSC. Afterward, slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 0.1 μ g/ μ L), and Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used as antifading agent.

Fluorescence signals were evaluated by counting 200 cells per slide using a fluorescence microscope equipped with a 100 \times oil objective (Nikon Eclipse E400, Nikon, Tokyo, Japan). Only discrete signals in nonoverlapping nuclei with a distinct nuclear border were evaluated. Losses of chromosome 14/14q—were defined as the lack of 1 signal in more than 10% of the nuclei scored for each of the probes used; this cutoff value was established on the basis of the frequency that cells appeared with an unexpectedly low number of hybridization signals in nuclei from normal cells.¹⁶

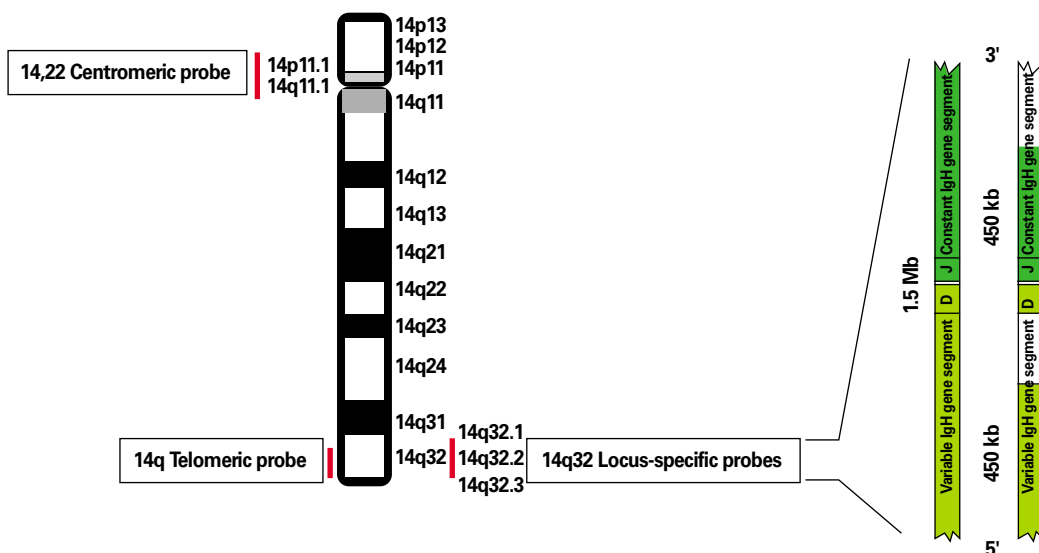


Figure 1 Schematic representation of chromosome 14 regions identified by the 4 different chromosome 14-specific probes used in this study. IgH, immunoglobulin heavy chain; kb, kilobase; Mb, megabase.

CGH Studies

Tumoral DNA used for CGH studies was isolated using conventional phenol-chloroform methods. Tumor DNA (test DNA) was labeled with biotin-16-dUTP (deoxyuridine triphosphate) (Roche, Basel, Switzerland), and normal DNA (reference DNA) was labeled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) by a standard nick-translation reaction. Equal amounts (2 µg) of labeled tumor and normal DNA and 15 µg of unlabeled human Cot-1 DNA (GIBCO/BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) were cohybridized to slides with human metaphase chromosome spreads prepared with stimulated lymphocytes from normal individuals (Normal 46XY metaphase CGH target slides, Vysis). After hybridization for 2 days in a moist chamber at 37°C, posthybridization washes were performed under stringent conditions with 0.1× SSC (42°C). Hybridized tumor and normal DNA were detected by avidin-fluorescein isothiocyanate (Roche) and a rhodamine-conjugated antidigoxigenin monoclonal antibody (Roche), respectively. The slides were counterstained with DAPI and mounted with an antifade solution.

Image acquisition was performed with an epifluorescence microscope (Olympus BX60, Olympus, Hamburg, Germany) equipped with a cooled charge-coupled device camera. Calculation of the tumor DNA/normal DNA fluorescence ratios along the length of each chromosome was performed by means of an automated CGH software package (Cytovision, Applied Imaging, Sunderland, England). Ratio values obtained from at least 19 metaphase cells were averaged for each case. Ratio values of more than 1.25 and less than 0.75 were considered to represent chromosomal gain and loss, respectively.

Statistical Methods

For all variables included in the present study, the mean and median values, SD, and range were calculated using the SPSS 11.0 software package (SPSS, Chicago, IL). The χ^2 and the Kruskal-Wallis tests were used to assess the statistical significance of the differences observed between groups. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method, and the 1-sided log-rank test was used to establish the statistical significance of the differences observed between curves. Statistical significance was considered to be present when *P* values were less than .05.

Results

Characterization of Chromosome 14 Losses by iFISH and CGH

Of the 124 cases studied, 50 showed loss (n = 18 [14.5%]) or gain (n = 32 [25.8%]) of 1 or more copies of chromosome 14 with the 2 probes specific for the 14q32 region (LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe and LSI IGH/CCD1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe) **Table 1**. Among the former group, all cases had loss of 1 fluorescence signal per nucleus, whereas chromosome gain consisted of a gain of 1 (n = 2 [1.6%]) or 2 (n = 30 [24.2%]) extra copies of this chromosome region. In all cases studied, both locus-specific probes provided identical results.

Two probes, one specific for the telomeric region of the long arm of chromosome 14 and the other specific for the repetitive α -satellite centromeric region of chromosome 14,

Table 1
Incidence of Chromosome 14 Abnormalities in 124 Patients With Meningioma According to Four Chromosome 14–Specific Probes

Probe	No. (%) of Chromosome 14 Fluorescence Spots per Nucleus		
	Decreased (<2)	Normal (2)	Increased (>2)
14q32 locus-specific*	18 (14.5)	74 (59.7)	32 (25.8)
Centromeric	16 (12.9)	76 (61.3)	32 (25.8)
Telomeric	16 (12.9)	76 (61.3)	32 (25.8)

* Identical results were obtained for the two 14q32 locus-specific probes analyzed.

then were applied to distinguish between loss of the entire long arm of chromosome 14 and partial 14q deletion. Application of these centromeric and telomeric probes revealed that 16 of 18 cases with loss of chromosome 14q32 lacked 1 centromeric and 1 telomeric fluorescence signal, suggesting the existence of the loss of 1 entire chromosome 14. In contrast, in the other 2 cases showing 14q32 deletion in 73% and 76% of all nuclei, the centromeric and telomeric regions were present in all tumor cell nuclei.

In all meningiomas studied that showed a normal or increased number of copies of the 14q32 chromosome region, identical results were obtained with the probes specific for the centromeric and the telomeric regions of chromosome 14 (Table 1).

Further characterization of chromosome 14 loss by CGH was performed in the 2 cases that showed loss only with the 14q32 locus-specific probes by iFISH. As control samples, 2 other cases showing chromosome 14 losses in 60% and 67% of all nuclei with the 14q32-specific probes and with the centromeric and telomeric probes were studied in parallel using CGH. CGH results confirmed the existence of a partial deletion of chromosome 14q extending from 14q31 to the 14q32 chromosome regions (Figure 2) in the former 2 cases; in contrast, in the latter 2 cases, a complete loss of chromosome 14 was found. These results would indicate that although most

meningiomas showing loss of chromosome 14q32 involve a loss of the entire chromosome, cases exist in which this is limited to an interstitial deletion.

Clinical and Biological Characteristics of Patients With Chromosome 14 Abnormalities

Table 2 shows the clinical and histopathologic characteristics of the 124 patients with meningioma whose data were analyzed according to chromosome 14 status. No major differences were found between diploid cases and cases with chromosome gain, except for a higher incidence of histopathologically malignant subtypes in the latter group (diploid, 2/74 [3%] vs gain, 7/32 [22%]; $P = .009$). In contrast, chromosome 14 losses were associated with a higher frequency of male patients ($P = .04$) and histologically malignant tumors ($P = .009$) together with a higher frequency of tumor relapse ($P = .003$). It should be noted that all except 1 patient with chromosome 14 loss and benign histologic features had meningotheliomatous tumors (Table 3).

Differentiating between patients with chromosome 14 loss in 16 cases showing monosomy 14 and 2 with interstitial deletions at 14q31-q32 revealed no statistically significant differences in the clinical-biological characteristics of either group, although neither of the 2 cases with interstitial deletions (cases 1 and 2, Table 3) had experienced relapse after follow-up of more than 10 and 5 years, respectively; 8 of the other 16 patients experienced relapse (Table 3). In line with this, patients with meningioma displaying monosomy 14 had a significantly lower relapse-free survival compared with diploid cases and patients showing gain of chromosome 14 or interstitial deletion at 14q31-q32 ($P = .03$) (Figure 3). Of the 8 patients with monosomy 14 and tumor recurrence, 6 (75%) experienced relapse between 2 and 6 times during follow-up (median \pm SD number of relapses per patient, 3 ± 2), whereas the number of recurrences observed among the other 13 patients with relapse but no chromosome 14 loss was slightly lower (median \pm SD number of relapses per patient, 2 ± 1 ; range, 1-6 relapses; $P = .11$).

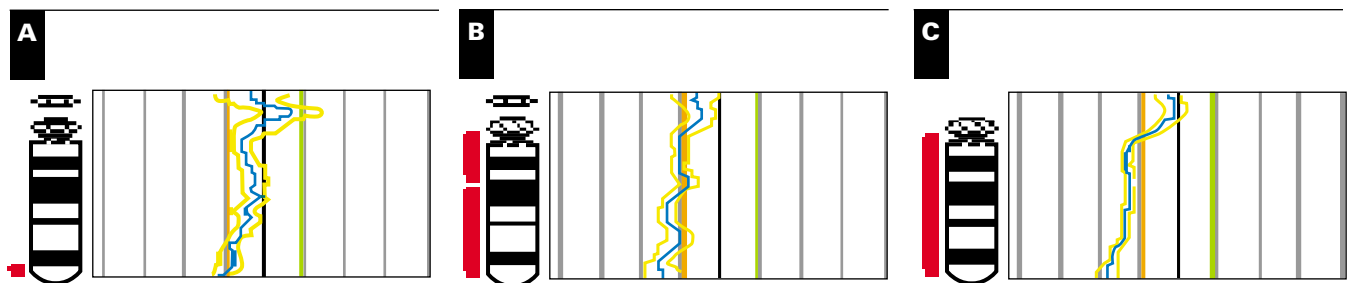


Figure 2 Comparative genomic hybridization profiles obtained in 3 meningiomas showing either interstitial deletions at 14q31-q32 (case 1, **A**) or entire loss of chromosome 14 (case 9, **B**; case 10, **C**). The number of metaphases analyzed in each case was 19, 28, and 27, respectively. Left red lines indicate loss of chromosomal material.

Table 2
Clinical and Histopathologic Characteristics of 124 Patients With Meningioma According to Abnormalities of Chromosome 14*

	Chromosome 14 Status			P
	Loss (n = 18)	Diploid (n = 74)	Gain (n = 32)	
Sex				.04
Male (n = 44)	11 (25)	22 (50)	11 (25)	
Female (n = 80)	7 (9)	52 (65)	21 (26)	
Age (y)	55 ± 16	56 ± 16	64 ± 11	.05
FCM ploidy status [†]				.23
Hypodiploid (n = 4)	1 (25)	1 (25)	2 (50)	
Diploid (n = 100)	12 (12)	61 (61)	27 (27)	
Hyperdiploid (n = 17)	5 (29)	9 (53)	3 (18)	
Tumor histologic features				.06
Meningotheliomatous (n = 79)	13 (16)	48 (61)	18 (23)	
Fibroblastic (n = 11)	1 (9)	8 (73)	2 (18)	
Transitional (n = 10)	0 (0)	8 (80)	2 (20)	
Psammomatous (n = 11)	0 (0)	8 (73)	3 (27)	
Atypical (n = 12)	4 (33)	2 (17)	6 (50)	
Anaplastic (n = 1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
Tumor grade (WHO classification)				.009
I (benign) (n = 111)	14 (13)	72 (65)	25 (23)	
II (atypical) (n = 12)	4 (33)	2 (17)	6 (50)	
III (anaplastic) (n = 1)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	
Tumor location				.12
Cerebral convexity (n = 36)	8 (22)	16 (44)	12 (33)	
Parasagittal and tentorial (n = 36)	6 (17)	20 (56)	10 (28)	
Ventricle (n = 3)	1 (33)	1 (33)	1 (33)	
Cranial base (n = 42)	3 (7)	30 (71)	9 (21)	
Spinal cord (n = 7)	0 (0)	7 (100)	0 (0)	
Tumor recurrence				.003
Yes (n = 21)	8 (38)	8 (38)	5 (24)	
No (n = 103)	10 (10)	66 (64)	27 (26)	

FCM, flow cytometry; WHO, World Health Organization.
 * Results are given as number (percentage) or mean ± 1 SD.
 † Ploidy status was assessed in only 121 cases.

Table 3
Clinical and Histopathologic Characteristics and iFISH Patterns for 18 Patients With Meningioma With Chromosome 14 Losses

Case No./Sex/ Age (y)	Grade	Tumor Location	Histologic Subtype	Recurrence/ No. of Recurrences	Relapse-Free Survival (mo)	Chromosome 14 Regions Probed		
						14q32	Telomeric	Centromeric
1/M/55	I	Convexity	M	No	121	L	N	N
2/F/66	I	Tentorial	M	No	70	L	N	N
3/M/60	I	Tentorial	M	Yes/4	39	L	L	L
4/F/64	I	Cranial base	M	No	121	L	L	L
5/M/53	I	Tentorial	M	Yes/3	30	L	L	L
6/M/63	I	Convexity	M	Yes/1	60	L	L	L
7/F/61	I	Convexity	M	No	58	L	L	L
8/M/62	I	Cranial base	M	No	94	L	L	L
9/M/46	I	Convexity	F	No	144	L	L	L
10/F/76	I	Convexity	M	No	55	L	L	L
11/F/64	I	Tentorial	M	No	43	L	L	L
12/M/62	I	Cranial base	M	No	83	L	L	L
13/M/23	I	Tentorial	M	No	8	L	L	L
14/M/41	I	Convexity	M	Yes/3	208	L	L	L
15/M/33	II	Ventricular	A	Yes/2	33	L	L	L
16/F/23	II	Convexity	A	Yes/6	118	L	L	L
17/M/73	II	Tentorial	A	Yes/2	7	L	L	L
18/F/72	II	Convexity	A	Yes/1	48	L	L	L

A, atypical; F, fibroblastic; L, chromosome loss; M, meningotheliomatous; N, normal number of copies.

Discussion

Meningiomas are considered benign tumors that frequently are cured with standard surgical procedures. However, between 10% and 20% of all patients eventually experience

relapse even after a complete resection of the tumor (also observed in the present study).^{22,25,27} In recent years, efforts have focused on the identification of the genetic abnormalities of meningiomas that could help predict the clinical behavior

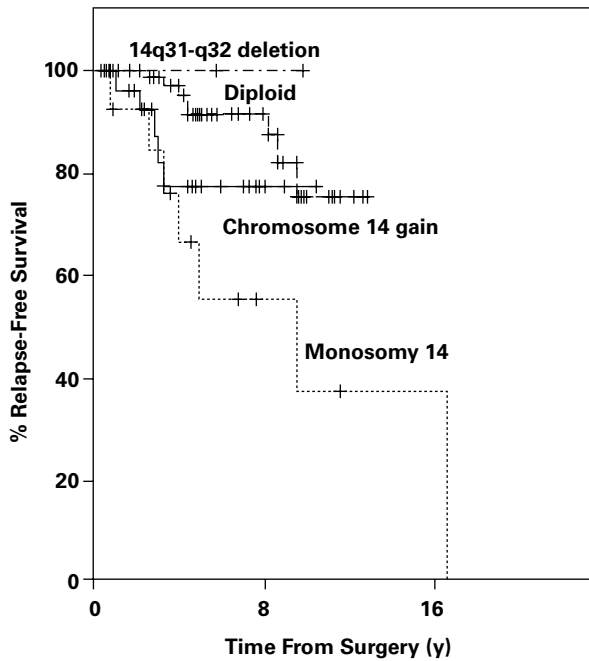


Figure 3 Patients with meningioma with monosomy 14 had significantly ($P = .03$) lower relapse-free survival (RFS) compared with diploid cases and patients showing gain of chromosome 14 or interstitial deletion at 14q31-q32. Deletion at 14q31-q32, $n = 2$; median RFS, not reached. Diploid, $n = 74$; median RFS, not reached. Chromosome 14 gain, $n = 32$; median RFS, not reached. Monosomy 14, $n = 16$; median RFS, 118.7 months.

of the tumor and distinguish between patients who are cured after surgery and those who remain at high risk of recurrence.

Complete loss or deletion of chromosome 22 has been shown to be by far the most frequent cytogenetic abnormality in meningiomas. However, at present, it is well established that monosomy 22/22q- has no impact on the clinical behavior of the disease. In turn, abnormalities of chromosome 14, including deletion, monosomy, or structural rearrangement of the genetic material of this chromosome, also have emerged as some of the most common recurrent chromosomal aberrations in patients with meningioma, present in 12% to 55% of the cases^{9,11,16,17,25,30-33} and confirmed by the present study. In contrast with monosomy 22/22q-, loss of chromosome 14 has been associated with a worse clinical outcome and a higher relapse rate, even among histologically benign meningiomas.^{15,27} Despite this, to our knowledge, no study has been reported in which the nature of abnormalities associated with loss of genetic material from chromosome 14 is characterized further in a large series of meningioma tumors.

Because conventional cytogenetic analyses fail to obtain metaphases in a significant proportion of cases and provide only information about a small part of all tumor cells, alternative

approaches such as iFISH usually are preferred for the direct investigation of a specific chromosomal or genetic abnormality. This is because iFISH techniques are particularly well suited to this purpose and allow systematic evaluation of specific chromosome abnormalities in all cells from each meningioma sample.

In the present study, 2 different patterns of loss of genetic sequences of chromosome 14 were observed using iFISH. Most commonly, a complete loss of the entire chromosome occurred, whereas limited interstitial deletions at 14q31-q32 were observed in a minor proportion of cases. In the former cases, the abnormality of chromosome 14 involved loss of the centromere of chromosome 14 and the 14q telomeric regions. In contrast, in the latter cases with deletions at 14q, both chromosome regions (telomeric and centromeric) were retained; CGH studies confirmed the existence in both tumors of a distal deletion of chromosome 14 between 14q31 and 14q32, with the telomeric regions preserved. Similar 14q deletion has been reported in neuroblastoma³⁴⁻³⁶ and astrocytoma³⁷; in turn, they are positioned distally to those described in other solid tumors, such as in bladder, gastrointestinal, and renal and ovarian cancer,³⁸⁻⁴¹ which show allelic losses at the 14q11-13, 14q23-24, and 14q32 regions, respectively.

In addition, Menon et al²⁴ and Leone et al⁴² have reported sporadic meningioma cases with loss of heterozygosity for the D14S13 (14q32.11) and D14S16 (14q32.32) markers but associated with a normal heterozygosity pattern for the distal flanking marker D14S23 (in the telomeric region), as also found in 2 of our cases. Between 14q31 and 14q32.3 there is a chromosome region containing the *IgH* gene and the *ELK-2*, a member of the *ETS* family of oncogenes, and *AKT*, a gene showing amplification in gastric adenocarcinoma, together with the *TCI-1* proto-oncogenes. Previous reports suggest that activation of these proto-oncogenes by mutation or translocation might lead to neoplastic transformation.⁴³⁻⁴⁷ Despite this, our results do not show more aggressive clinical behavior for patients with interstitial deletions at 14q32. Further studies in larger series of patients with a 14q deletion limited to the 14q32.2 region in which the expression of the *ELK-2*, *AKT*, and *TCI-1* proteins also is analyzed are necessary to confirm the potential role of these genes once deleted, in determining the clinical behavior of meningioma.

From a histologic viewpoint, several groups have reported that allelic losses in 14q occur more frequently in atypical and malignant meningiomas than in grade I tumors and that the presence of such allelic losses in histologically benign meningiomas could be associated with more aggressive tumors and a higher probability of tumor recurrence.^{9,21,26} In the present study, 12 of 16 patients with meningioma with monosomy 14 had histologically benign tumors, and the other 4 patients had atypical meningiomas. Despite the apparently higher incidence of histologically benign tumors among our cases compared

with that reported by Simon et al,²⁶ a great proportion of all benign tumors showing 14q deletion relapsed, as did those with atypical morphologic features; the mean number of relapses observed among these cases was slightly higher than that of other relapsed meningiomas that showed no chromosome 14 loss. In turn, the 2 cases with limited interstitial deletion at 14q31-q32 were histologically benign meningiomas and showed no recurrence. Although the number of cases with distal interstitial deletion at 14q31-q32 is low, our results suggest that, in contrast with meningiomas showing more extensive deletion of chromosome 14, these cases could be associated with benign histopathologic subtypes and a better prognosis, in the absence of tumor recurrence.

For meningiomas associated with chromosome 14 gains, we found a greater incidence of histologically malignant cases, but this was not associated with a higher incidence of recurrence or a shorter disease-free survival. This finding concurs with the observations reported by Mertens et al,⁴⁸ who showed that loss of chromosome segments was more important than gain in the development of most malignant solid tumors.

The clear association found in the present study between extensive loss of genetic material from chromosome 14 and both tumor recurrence and relapse-free survival support the presence of one or more tumor suppressor genes in this chromosome, outside the 14q31-q32 region. Its exact role in determining the clinical-biologic behavior of meningiomas remains to be established.

Our results show that in most cases with chromosome 14 loss, loss of the entire chromosome occurs, with interstitial deletion of 14q present in the remaining cases. Among these patients, relapses were restricted to those with monosomy 14.

From the ¹Research Unit and ²Neurosurgery and ³Hematology Services, University Hospital of Salamanca, Salamanca; and ⁴Cancer Research Center, Cytometry General Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain.

Supported in part by grants FIS 01/1564 and FIS 02/0010 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Madrid; HUS2/03 from Junta de Castilla y León, Valladolid; Foundation "Memoria D. Samuel Solórzano Barruso," Salamanca; the Ministry of Science and Technology Ramón y Cajal Program (Dr Taberero), Madrid; and grants 02/0010 (Ms Espinosa) and 02/9103 (Mr Sayagués) from the Ministry of Health, Madrid, Spain.

Address reprint requests to Dr Taberero Redondo: Hospital Universitario de Salamanca, Laboratorio Unidad de Investigación. Edificio Maternidad 2ª Planta, Paseo de San Vicente 58-182. 37007 Salamanca, Spain.

** Contributed equally to the study, and both should be considered first authors.*

References

1. Berra B, Papi L, Bigozzi U, et al. Correlation between cytogenetic data and ganglioside pattern in human meningiomas. *Int J Cancer*. 1991;47:329-333.
2. Casalone R, Simi P, Granata P, et al. Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 65 human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990;45:237-243.
3. Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Barcia-Salorio J, et al. Evolution to malignancy in a recurrent meningioma: morphological and cytogenetic findings. *Clin Neuropathol*. 1998;17:210-215.
4. Cerda-Nicolas M, Lopez-Gines C, Perez-Bacete M, et al. Histopathological and cytogenetic findings in benign, atypical and anaplastic human meningiomas: a study of 60 tumors. *Clin Neuropathol*. 2000;19:259-267.
5. Debiec-Rychter M, Biernat W, Limon J, et al. Cytogenetic and proliferative potentials in meningiomas. *Pol J Pathol*. 1999;50:243-248.
6. Doco-Fenzy M, Cornillet P, Scherpereel B, et al. Cytogenetic changes in 67 cranial and spinal meningiomas: relation to histopathological and clinical pattern. *Anticancer Res*. 1993;13:845-850.
7. Katsuyama J, Papenhausen PR, Herz F, et al. Chromosome abnormalities in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;22:63-68.
8. Lekanne Deprez RH, Rieghman PH, van Drunen E, et al. Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54:224-235.
9. Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio JL, et al. Cytogenetic findings of recurrent meningiomas; a study of 10 tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995;85:113-117.
10. Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, et al. Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer*. 1996;77:2567-2573.
11. Vagner-Capodano AM, Grisoli F, Gambarelli D, et al. Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 75 human meningiomas. *Neurosurgery*. 1993;32:892-900.
12. Yamada K, Kasama M, Kondo T, et al. Chromosome studies in 70 brain tumors with special attention to sex chromosome loss and single autosomal trisomy. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994;73:46-52.
13. Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H, et al. Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas; a study of 189 tumors. *Ann Genet*. 1998;41:164-175.
14. Arnoldus EP, Noordermeer IA, Peters AC, et al. Interphase cytogenetics of brain tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1991;3:101-107.
15. Cai DX, Banerjee R, Scheithauer BW, et al. Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subsets of meningioma: diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:628-636.
16. Sayagués JM, Taberero MD, Maíllo 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.
17. Schneider BF, Shashi V, von Kap-herr C, et al. 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.
18. Weber RG, Bostrom J, Wolter M, 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.
19. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258:818-821.

20. Ozaki S, Nishizaki T, Ito H, et al. Comparative genomic hybridization analysis of genetic alterations associated with malignant progression of meningioma. *J Neurooncol.* 1999;41:167-174.
21. Maíllo A, Orfao A, Sayagués JM, et al. A new classification scheme for the prognostic stratification of meningioma based on chromosome 14 abnormalities, patient's age and tumor histopathology. *J Clin Oncol.* 2003;21:3285-3295.
22. Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, et al. 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.
23. Maíllo A, Díaz P, Sayagués JM, et al. Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer.* 2001;92:377-385.
24. Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP, et al. Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative "tumor progression" locus. *Oncogene.* 1997;14:611-616.
25. Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, et al. A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer.* 2000;88:440-453.
26. Simon M, von Deimling A, Larson JJ, 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.
27. Tse JY, Ng HK, Lau KM, et al. Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol.* 1997;28:779-785.
28. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002;61:215-225.
29. Perry A, Banerjee R, Lohse CM, et al. A role for chromosome 9p21 deletions in the malignant progression of meningiomas and the prognosis of anaplastic meningiomas. *Brain Pathol.* 2002;12:183-190.
30. Ketter R, Henn W, Niedermayer I, 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.
31. Maltby EL, Ironside JW, Battersby RD. Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988;31:199-210.
32. Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, et al. Chromosomal involvement secondary to -22 in human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988;33:275-290.
33. 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.
34. Hoshi M, Otagiri N, Shiwaku HO, et al. Detailed deletion mapping of chromosome band 14q32 in human neuroblastoma defines a 1.1-Mb region of common allelic loss. *Br J Cancer.* 2000;82:1801-1807.
35. Takayama H, Suzuki T, Mugishima H, et al. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene.* 1992;7:1185-1189.
36. Theobald M, Christiansen H, Schmidt A, et al. Sublocalization of putative tumor suppressor gene loci on chromosome arm 14q in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999;26:40-46.
37. Hu J, Pang JC, Tong CY, et al. High-resolution genome-wide allelotyping analysis identifies loss of chromosome 14q as a recurrent genetic alteration in astrocytic tumours. *Br J Cancer.* 2002;87:218-224.
38. Bandera CA, Takahashi H, Behbkht K, et al. Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1997;57:513-515.
39. Chang WY, Cairns P, Schoenberg MP, et al. Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer. *Cancer Res.* 1995;55:3246-3249.
40. Debiec-Rychter M, Sciort R, Pauwels P, et al. Molecular cytogenetic definition of three distinct chromosome arm 14q deletion intervals in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001;32:26-32.
41. Mitsumori K, Kittleson JM, Itoh N, et al. Chromosome 14q LOH in localized clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2002;198:110-114.
42. Leone PE, Bello MJ, de Campos JM, et al. NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene.* 1999;18:2231-2239.
43. Aoki M, Batista O, Bellacosa A, et al. The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14950-14955.
44. Harindranath N, Mills FC, Mitchell M, et al. The human *elk-1* gene family: the functional gene and two processed pseudogenes embedded in the *IgH* locus. *Gene.* 1998;221:215-224.
45. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al. Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:3028-3033.
46. Staal SP, Huebner K, Croce CM, et al. The *AKT1* proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics.* 1988;2:96-98.
47. Virgilio L, Narducci MG, Isobe M, et al. Identification of the *TCL1* gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12530-12534.
48. Mertens F, Johansson B, Hoglund M, et al. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res.* 1997;57:2765-2780.

3.5.- ARTÍCULO 5: Identificación de alteraciones en el número de copias de pequeñas regiones del cromosoma 14 en meningiomas mediante técnica de “arrays” de hibridación genómica comparada (“arrays” de CGH) con sondas de alta resolución (clones BAC).

OBJETIVO. En los pacientes con meningioma, las pérdidas del cromosoma 14 se asocian con un comportamiento clínico más agresivo. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios de “arrays” de CGH de alta resolución, donde se analice en su totalidad el cromosoma 14 de estos pacientes. El objetivo de este trabajo se centró en la elaboración de un “array” de CGH de alta resolución dirigido frente al cromosoma 14 humano, con el fin de identificar la localización exacta y la extensión de los cambios existentes en el número de copias de diferentes regiones de este cromosoma, en pacientes con meningioma.

MÉTODOS. Para la construcción del “array” de CGH se emplearon 807 clones de ADN específicos de diferentes regiones del cromosoma 14, contenidos en cromosomas artificiales de bacterias (BACs); con estos clones, la resolución media alcanzada fue de 130Kb. A continuación, el “array” se hibridó con muestras tumorales de un total de 25 pacientes con meningioma con el fin de caracterizar las alteraciones del número de copias de las diferentes regiones del cromosoma 14. En paralelo, se marcaron secuencias contenidas en el “array” y se utilizaron como sondas en estudios de hibridación in situ fluorescente sobre núcleos interfásicos (iFISH) al objeto de validar los resultados de los estudios de CGH.

RESULTADOS. En conjunto, se detectaron anomalías del cromosoma 14 en 10/25 casos (40%) analizados. En siete de estos casos se observaron pérdidas en la región 14q32.3 mediante iFISH, que con el “array” de CGH se confirmó correspondían a monosomía 14. En los tres casos restantes se detectaron discrepancias entre los estudios de iFISH y CGH. Así, en un paciente se observó un cariotipo diploide mediante iFISH, mientras que los estudios de CGH revelaron la existencia de monosomía 14. En los otros dos casos, que mostraban ganancias en la región 14q32 por iFISH, el perfil de “array” de CGH no detectó una variación en el número de copias en un caso que presentaba un cariotipo tetraploide; en el otro tumor se detectaron diferentes desequilibrios genéticos a lo largo de todo el brazo largo del cromosoma 14.

CONCLUSIÓN. En resumen, en este trabajo hemos elaborado y testado un “array” de CGH específico para el cromosoma 14 humano, aplicándolo por primera vez al estudio de este cromosoma en meningiomas. Los resultados obtenidos confirman que la alteración más frecuente en este cromosoma es la pérdida total del mismo o monosomía 14, detectándose de forma esporádica otro tipo de alteraciones.

ARTICLE

Array-based comparative genomic hybridization of mapped BAC DNA clones to screen for chromosome 14 copy number abnormalities in meningiomas

Ana Belén Espinosa¹, Carlos Mackintosh², Angel Maíllo³, Laura Gutierrez⁴, Pablo Sousa³, Marta Merino³, Javier Ortiz⁵, Enrique de Alava², Alberto Orfao⁴ and María Dolores Taberero^{*,1,6}

¹Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ²Laboratory of Molecular Pathology, Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain; ³Neurosurgery Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (CSIC-USAL), Cytometry General Service and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁵Pathology Service, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; ⁶IECSCYL-Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

Chromosome 14 loss in meningiomas are associated with more aggressive tumour behaviour. To date, no studies have been reported in which the entire chromosome 14q of meningioma tumour cells has been studied by high-resolution array comparative genomic hybridization (a-CGH). Here, we used a high-resolution a-CGH to define the exact localization and extent of numerical changes of chromosome 14 in meningioma patients. An array containing 807 bacterial artificial chromosome clones specific for chromosome 14q (average resolution of ~130 Kb) was constructed and applied to the study of 25 meningiomas in parallel to the confirmatory interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) analyses. Overall, abnormalities of chromosome 14q were detected in 10/25 cases (40%). Interestingly, in seven of these cases, loss of chromosome 14q32.3 was detected by iFISH and confirmed to correspond to monosomy 14 by a-CGH. In contrast, discrepant results were found between iFISH and a-CGH in the other three altered cases. In one patient, a diploid background was observed by iFISH, while monosomy 14 was identified by a-CGH. In the remaining two cases, which showed gains of the IGH gene by iFISH, a-CGH did not detect copy number changes in one case showing a tetraploid karyotype, while in the other tumour, varying genetic imbalances along the long arm of chromosome 14 were detected. In summary, here, we report for the first time, the high-resolution a-CGH profiles of chromosome 14q in meningiomas, confirming that monosomy 14 is the most frequent alteration associated with this chromosome; other numerical abnormalities being only sporadically detected.

European Journal of Human Genetics (2008) 0, 000–000. doi:10.1038/ejhg.2008.128

Keywords: chromosome 14; array CGH; BAC probes; loss; gain; meningioma

*Correspondence: Dr MD Taberero, Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo de San Vicente 58, Salamanca 37007, Spain.

Tel: +923 29 12 30; Fax: +923 29 46 24;

E-mail: taberero@usal.es

Received 4 March 2008; revised 16 May 2008; accepted 19 June 2008

Introduction

Among other chromosomal abnormalities, meningioma patients frequently display alterations of chromosome 14q as detected by both cytogenetic and molecular techniques.^{1–5} In recent years, evidence has accumulated about the existence of a clear association between chromosome

14 loss and male sex,⁶ as well as a more aggressive behaviour of the disease and a shorter recurrence-free survival.^{1–3,5,7–10} Overall, these findings suggest that one or more tumour suppressor genes might be responsible for the adverse prognostic impact of chromosome 14 loss in meningioma patients, the specific relevant genes remaining to be identified. This could be, at least in part, because of the fact that no studies have characterized in detail the chromosome 14 imbalances occurring in meningiomas, through the use of high-resolution genetic/molecular approaches. Despite this, the inactivation of NDRG2 gene, localized at the chromosome 14q11.2 region, has been recently reported in histologically malignant meningiomas.¹¹

Array-based comparative genomic hybridization (a-CGH) is a powerful technique developed to detect copy number variation (CNV) of specific DNA sequences with higher resolution¹² than the conventional approaches – for example, conventional karyotyping and metaphase CGH.^{2,13–17} This assay is based on a competitive hybridization between tumour and control DNA, labelled with different fluorochromes, to previously defined chromosome sequences inserted into well-characterized genomic clones – for example, bacterial (BAC) or P1-derived artificial chromosomes (PAC) – spotted onto glass slides^{18–20} with a resolution of around between 100 Kb and 1 Mb.^{21–23}

In this study, we have built an a-CGH to get detailed information about CNV involving specific DNA sequences of chromosome 14q in a series of 25 meningioma tumours. Our major goal was to validate previous results about chromosome 14q abnormalities detected in meningiomas, usually through the use of an interphase fluorescence *in situ* hybridization (iFISH) probe directed to the IGH gene locus at 14q32.3,⁵ and to finely map DNA imbalances of chromosome 14q from these patients, by using 807 different DNA clones aimed at mapping the 107 Mb of chromosome 14. To our knowledge, this is the first study in which chromosome 14 abnormalities have been analysed in meningiomas using high-resolution a-CGH. Our results confirm that the entire loss of chromosome 14 is the most frequent alteration in these tumours, although distinct and varying changes may be observed in specific cases.

Materials and methods

Patients and samples

A total of 25 meningioma samples from 24 different individuals who underwent diagnostic curative surgery at the Neurosurgery Service of the University Hospital of Salamanca, between February 2003 and November 2006, were randomly selected from a larger series of 171 patients to be included in this study. Twelve of the 25 samples used in this study had been also included in a previous report.¹⁰ All tumour samples but one corresponded to primary tumours; the other sample was from a recurrent menin-

gioma. In all patients, diagnosis and classification of meningioma were performed according to the WHO criteria.²⁴ The most relevant clinical and histopathological characteristics of the cases analysed are shown in Table 1.

In addition, the following samples were used as reference DNA: (a) a DNA pool from peripheral blood (PB) leucocytes from healthy female ($n=25$) and male ($n=15$) volunteers; (b) constitutional DNA from each of the meningioma patients studied and (c) DNA from normal meningeal female ($n=4$) cells, kindly provided by C Caballero and T Tuñón from the Neurological Tissue Bank of Navarra (Pamplona, Spain). In all cases, both tumour DNA and normal reference DNA were extracted using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the instructions of the manufacturer.

The study was approved by the ethical committee of the local University Hospitals of Salamanca and Navarra and samples were obtained only after the informed consent was given by the individual.

Array comparative genomic hybridization studies

Full genomic coverage clones for chromosome 14q provided by the BACPAC Resources Children's Hospital Oakland Research Institute (<http://bacpac.chori.org>) were used for a-CGH analyses. These included a total of 807 DNA clones with a median size of 200 Kb and an average spacing of ~130 Kb, as defined by the overlapping BAC segments. In addition, 110 BAC and PAC clones mapping to different regions of human chromosome X (Wellcome Trust; Sanger Institute, Cambridge, UK) and 16 different autosomal chromosomes other than chromosome 14 were also used in parallel to chromosome 14 BAC clones for data normalization. Clone position along the chromosomes was determined using the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu>).

After growing the clones in 2XYT culture medium, automated extraction of the clones' DNA was performed using the R.E.A.L. Prep BioRobot kit (Qiagen) and the BioRobot 3000 (Qiagen). Afterward, DNA from each BAC clone was amplified by DOP-PCR as described previously.²⁰ The amplified DNA sequences were then spotted (spot diameter of approximately 150 μ m) in triplicate onto CodeLink Activated Slides (GE Healthcare, Fairfield, CT), using the MicroGrid II arrayer (BioRobotics, Cambridge, UK). Before DNA hybridization, 500 ng of both tumour genomic DNA and reference DNA were labelled by random priming with Cy5 dCTP and Cy3 dCTP, respectively (GE Healthcare), precipitated with 100 μ g of Cot-1 DNA (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and dissolved in hybridization buffer. Hybridization of the array – blocked with 80 μ g of herring sperm DNA (Sigma) and 100 μ g of Cot-1 DNA – was performed in a moist chamber at 42°C for 48 h. Afterward, the array was scanned in the GenePix 4000B scanner (Axon Instruments Inc., Union City, CA). High-resolution a-CGH of each tumour sample DNA was

Table 1 Chromosome 14 status in meningioma tumours ($n = 25$) as analysed by both iFISH and array CGH and its relationship with other clinical and histopathological disease characteristics

Case ID	Gender	Age at diagnosis or recurrence (years)	Tumour localization	Tumour histopathology	Recurrence	RFS (months)	Monosomy 14q in the ancestral tumour cell clone	Chromosome 14 status	
								iFISH (14q32.3 probe)	Array CGH
3	Female	76	Tentorial	Transitional	NR	54	No	Diploid	Diploid
4	Female	68	Convexity	Psammomatous	NR	55	No ^b	Diploid	Diploid
8	Male	56	Cranial base	Transitional	NR	52	No	Diploid	Diploid
11	Female	68	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	50	No	Diploid	Diploid
12	Female	36	Spinal	Transitional	NR	43	No	Diploid	Diploid
13	Female	77	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	35	No	Diploid	Diploid
14	Male	54	Cranial base	Fibroblastic	NR	34	No	Diploid	Diploid
15	Female	54	Cranial base	Transitional	NR	27	No	Diploid	Diploid
16	Female	26	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	27	No ^b	Diploid	Diploid
18	Female	65	Spinal	Psammomatous	NR	27	No	Diploid	Diploid
19	Female	53	Tentorial	Fibroblastic	NR	27	No	Diploid	Diploid
20	Female	69	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	26	No	Diploid	Diploid
21	Female	42	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	25	No	Diploid	Diploid
22	Female	65	Spinal	Psammomatous	NR	18	No	Diploid	Diploid
23	Female	77	Tentorial	Meningotheliomatous	NR	17	No	Diploid	Diploid
24	Male	68	Tentorial	Meningotheliomatous	NR	14	Yes ^b	Diploid	Diploid
1	Male	41	Convexity	Meningotheliomatous	Yes	242 ^c	Yes ^b	Loss	Monosomy
5	Female	60	Convexity	Meningotheliomatous	Yes	30 ^c	Yes ^b	Loss	Monosomy
5R ^d	Female	62	Convexity	Meningotheliomatous	NR	22	Yes	Loss	Monosomy
6	Female	52	Tentorial	Atypical	NR	52	Yes ^b	Loss	Monosomy
7	Female	70	Cranial base	Meningotheliomatous	NR	52	Yes	Loss	Monosomy
10	Female	60	Tentorial	Transitional	NR	50	Yes ^b	Loss	Monosomy
17	Female	84	Tentorial	Meningotheliomatous	NR	27	Yes ^b	Loss	Monosomy
2	Female	62	Convexity	Meningotheliomatous	NR	56	No ^b	Gain ^e	Diploid
9	Male	76	Convexity	Meningotheliomatous	NR	51	No ^b	Loss/Diploid/ Gain ^f	Diploid/ Gain ^g

^aThese copy number changes were detected with the following BAC clone probes: CTD-2120P12, RP11-433O19, RP11-73E17, RP11-700L24, RP11-746C4, RP11-31E3, RP11-536A5, RP11-410E23, RP11-532E10, RP11-493E18 and RP11-84H9.

^bCases with associated del(1p36) in the ancestral tumour cell clone.

^cTumour recurrence occurred at this time. NR = no recurrence till the moment of closing this study.

^dCase 5R corresponds to the first tumour recurrence of case 5.

^eFour.

^fThree fluorescence signals detected.

^gLosses detected with BAC probes CTD-2120P12, RP11-433O19, RP11-73E17, RP11-746C4, RP11-31E3, RP11-536A5 and RP11-410E23; diploid regions shown with the RP11-700L24 BAC probe, and gain detected with the RP11-493E18 BAC probe.

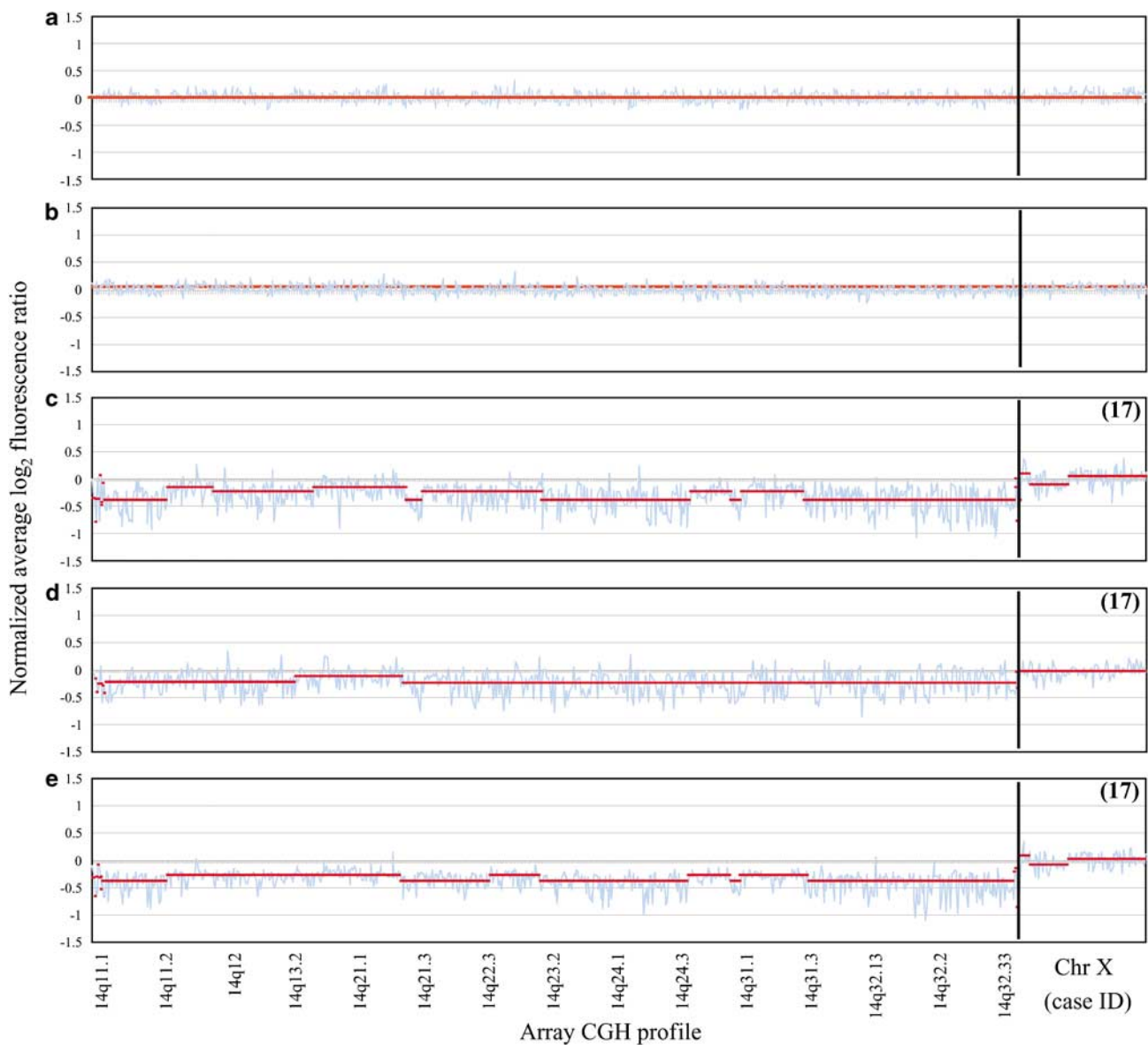


Figure 1 Illustrating high-resolution array comparative genomic hybridization (a-CGH) profiles for chromosome 14 of a female meningioma tumour representative of 25 cases studied. A-CGH profiles obtained after hybridizing DNA from a normal female vs another normal female and DNA from a normal male vs another normal male are shown in (a and b), respectively. In (c–e), female tumour DNA (case 17) was hybridized against three different reference DNA samples used to validate the hybridization method: a pool of peripheral blood DNA from 25 healthy females (c), constitutional DNA from the same meningioma patient (d) and normal female meningeal cells' DNA (e), respectively. In all plots, BAC clones used are ordered from the centromere to the telomere of chromosome 14 in the X-axis, at the left of the vertical bar; at the right of the vertical bar, the hybridization profiles obtained for control BAC clones against different regions of chromosome X, are also shown. In the Y-axis, the average normalized \log_2 ratios of the fluorescence signals detected for the three replicated spots measured in individual experiments for each BAC clone on the array are displayed. Fluctuating ratios observed in (c and d) could be due to the copy number variations in chromosome 14 regions identified by specific BAC clones and/or technical artefacts related to variability in the hybridization.

performed against a DNA pool from healthy females (Figure 1c), constitutional DNA from the same meningioma patient (Figure 1d) and a DNA pool from normal meningeal female cells (Figure 1e). Scanned images were analysed using the GenePix Pro 4.0 software (Axon Instruments Inc.). Only those spots with clear hybridiza-

tion signals and the expected size and shape were used to normalize data. Chromosome X clones and autosomal chromosomes other than chromosome 14 clones were used for data normalization. Normalized data were subsequently processed with the snapCGH bioconductor software package (CRAN – Comprehensive R Archive Network,

<http://cran.r-project.org/>) after removing spots with an $SD > 0.2$ as well as those 'low-quality' spots flagged by the GenePix software. DNA copy number algorithms and Merge Levels scripts (snapCGH software package), including a \log_2 transformation of the Cy5/Cy3 ratio values, were then applied to data corresponding to each DNA clone. A conventional \log_2 ratio threshold of ± 0.25 was used to identify gains and losses of specific regions of chromosome 14. The quality of a-CGH results was tested by performing control hybridizations with the reference DNA samples described above. All control hybridizations (Figure 1a and b) were performed in parallel to the analysis of tumour samples, using the same batch of arrays under the identical labelling and hybridization conditions.

iFISH studies with the 14q32 probe

iFISH studies with the 14q32.3 probe (LSI IGH/BCL2 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe, Vysis Inc., Downers Grove, IL) were performed in all cases on fresh tumour samples as described elsewhere.⁵

iFISH analysis of chromosome 14 with fluorescently labelled BAC probes

To confirm the presence of CNV of specific regions of chromosome 14q detected by a-CGH, 11 BAC clone probes used in the array (Table 2) were fluorescently labelled by nick translation (Nick Translation Kit; Vysis Inc.) for further iFISH analyses. To assess the correct mapping of the BAC clones on chromosome 14, before hybridization with tumour cells, labelled chromosome 14 BAC probes were hybridized to normal metaphases (Vysis Inc.) using previously reported techniques.⁵ Those probes, which showed cohybridization in chromosomes other than chromosome 14 were discarded from further analyses. Hybridized slides were examined visually using an Olympus microscope equipped with the appropriate set of filters for DAPI and Spectrum Red. For each probe, only those spots ($n \geq 200$) with similar intensity and shape were counted in areas with $< 1\%$ unhybridized nuclei.

Table 2 BAC clones ($n = 11$) used to validate the results of array comparative genomic hybridization (a-CGH)

BAC clone	Starting bp	Ending bp	Number of bp	Localization
CTD-2120P12	20238025	20398600	160575	14q11.2
RP11-433O19	33950156	34130673	180517	14q13.1
RP11-73E17	34343505	34485026	141521	14q13.2
RP11-700L24	64190857	64415593	224736	14q23.3
RP11-746C4	72480956	72642631	161675	14q24.2
RP11-31E3	73034707	73200904	166197	14q24.3
RP11-536A5	74082799	74277120	194321	14q24.3
RP11-410E23	83142999	83279501	136502	14q31.2
RP11-532E10	103230563	103442515	211952	14q32.33
RP11-493E18	103877829	104082121	204292	14q32.33
RP11-84H9	105325858	105501944	176086	14q32.33

Results

Overall, most a-CGH results were in agreement with those revealed by iFISH studies performed with the 14q32 probe (Table 1). Accordingly, a-CGH confirmed the existence of loss of chromosome 14q compatible with monosomy 14 (Table 1 and Figure 2a) in all seven cases showing del(14q32) by iFISH; additionally, one case displaying a diploid background by iFISH with the 14q32.3 probe, showed monosomy by a-CGH (Table 1). In turn, no loss of chromosome 14q was observed in the remaining meningioma tumours where both iFISH with the 14q32.3 probe and a-CGH results were compatible with a diploid ($n = 15$) content (Table 1 and Figure 2b). In contrast, among those two cases showing gains of chromosome 14 with the 14q32 iFISH probe, a-CGH did not detect CNV in one case showing a tetraploid karyotype in 35% of the nuclei, while in the other tumour, carrying 20% of cells showing trisomy 14 with the 14q32 iFISH probe, varying genetic imbalances along the long arm of chromosome 14 were observed (Table 1 and Figure 3a). In this later tumour, the ratio goes down between the regions covered by the 14q11.2–14q21.2 and the 14q24.1–14q32.12 BAC clones. As individual clone ratios are difficult to judge, iFISH with clones RP11-678F17 to RP11-714L5 and RP11-368B1 to RP11-693P5 were applied to confirm the occurrence of a hemizygous deletion in both regions of approximately 27 and 26 Mb, respectively. Interestingly, these 14q deletions coexisted in this tumour with an increased number of copies of a region of approximately 11 Mb localized distal to the deleted regions, between 14q32.2 and the telomere of chromosome 14q (clones RP11-306M6 to CTD-2313E3). Finally, in this same tumour, in between the two deleted 14q regions a diploid background was observed at the 14q21.3–q23.3 and 14q32.13 regions with a length of 21 and 3 Mb, respectively (clones RP11-6F8 to RP11-313C5 and RP11-371E8 to RP11-241N4; Table 1 and Figure 3a).

Complementary iFISH analyses were performed with a variety of chromosome 14q probes derived from the set of BAC clones used for the a-CGH studies (Table 2). Overall, a high degree of agreement was found between the \log_2 ratios obtained by a-CGH and the results of iFISH analyses performed with these probes (Table 1). Accordingly, iFISH studies showed the entire loss of chromosome 14q with all the BAC probes in seven or eight cases displaying monosomy 14 by a-CGH; interestingly, in the remaining case, a diploid iFISH pattern was observed for the BAC clones in line with the results obtained also with the 14q32.3 iFISH probe (Table 1), with more than 90% of the tumour cells displaying two iFISH signals. In addition, a cell clone showing tetrasomy 14 in 35% of the nuclei was confirmed along the long arm of chromosome 14 with all the BAC probes used in a case displaying four fluorescence signals with the commercial 14q32 IGH gene probe and a diploid a-CGH profile. In the remaining case shown to be altered by a-CGH, the different BAC clones tested

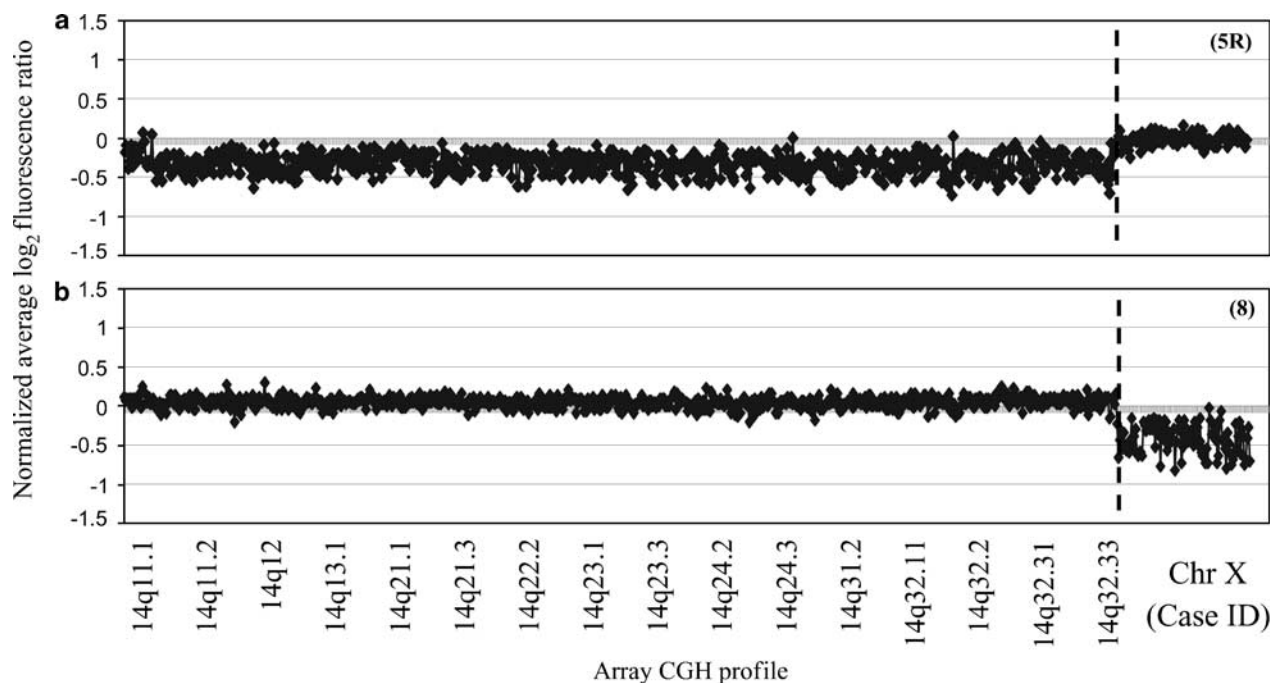


Figure 2 Illustrating a-CGH profiles of a case (case 5R) showing an abnormally reduced number of copies for all 14q BAC clones analysed, indicating the existence of complete loss of one copy of chromosome 14q (a) and a diploid meningioma tumour from a male patient (case 8) against reference female DNA (b). The X-axis shows chromosome 14 clones ordered from the centromere (left hand side) to the telomere (right hand side). Dots at the right of the vertical bar indicate the control clones from chromosome X.

confirmed the coexistence of allelic deletions – probes: CTD-2120P12 (14q11.2), RP11-433O19 (14q13.1), RP11-73E17 (14q13.2), RP11-746C4 (14q24.2), RP11-536A5 (14q24.3) and RP11-410E18 (14q31.2) with an average log₂ ratio by a-CGH of -0.42 , -0.24 , -0.37 , -0.32 , -0.26 and -0.26 , respectively – and gains – probe RP11-493E18 (14q32.33) with an average log₂ ratio by a-CGH of 0.42 – with normal number of copies for the RP11-700L24 (14q23.3) BAC clone – average log₂ ratio of 0.06 (Table 1 and Figure 3). In turn, all other 15 cases showing normal diploid a-CGH profiles showed also a diploid content for the iFISH probes used.

Discussion

Loss of chromosome 14 has been recurrently reported in a significant proportion of meningiomas. From the clinical point of view, chromosome 14 loss has been associated with a shorter recurrence-free survival, independently of tumour histopathology, particularly when detected in all tumour cells in the sample (eg, in the ancestral tumour cell clone) in association with $\text{del}(1\text{p}36)$.^{3,9,10,25} Altogether, these results suggest the presence of one or more tumour suppressor genes in this chromosome. Despite this, few studies have been reported so far in which a more precise characterization of the genetic changes involving chromo-

some 14, aimed at a better understanding of the clinical behaviour of the tumour, have been analysed. High-resolution a-CGH has been applied to the study of meningiomas focusing on the analysis of chromosomes other than 14q, such as chromosome 1,²⁶ 18²⁷ and 22.^{27,28} To the best of our knowledge, this is the first report in which high-resolution a-CGH is applied to the analysis of chromosome 14 in meningiomas. The increased resolution of a-CGH is directly related to the development of thousands of BAC clones that allow for the analysis of the entire human genome including chromosome 14²³ and the availability of overlapping BAC clones for each chromosome region of interest. Adjacent and overlapping clones can be used together to increase the efficiency and accuracy of the analysis, as the tile-path array in which a set of overlapping clones are used, deletions or gains larger than or equal to a single clone, frequently involve also neighbouring clones.²¹ In this study, we used a total of 807 BAC clones to map the long arm of chromosome 14; with such clones, insert sizes of between 100 and 300 kb were obtained which would allow the identification of alterations in relatively small regions. To avoid overinterpretation of changes at single clones due to the technical artefacts,¹⁸ CNV were only defined when altered fluorescence ratios were observed in two or more consecutive clones. The use of both constitutional and normal female meningeal cells' DNA, as reference DNA in the hybridiza-

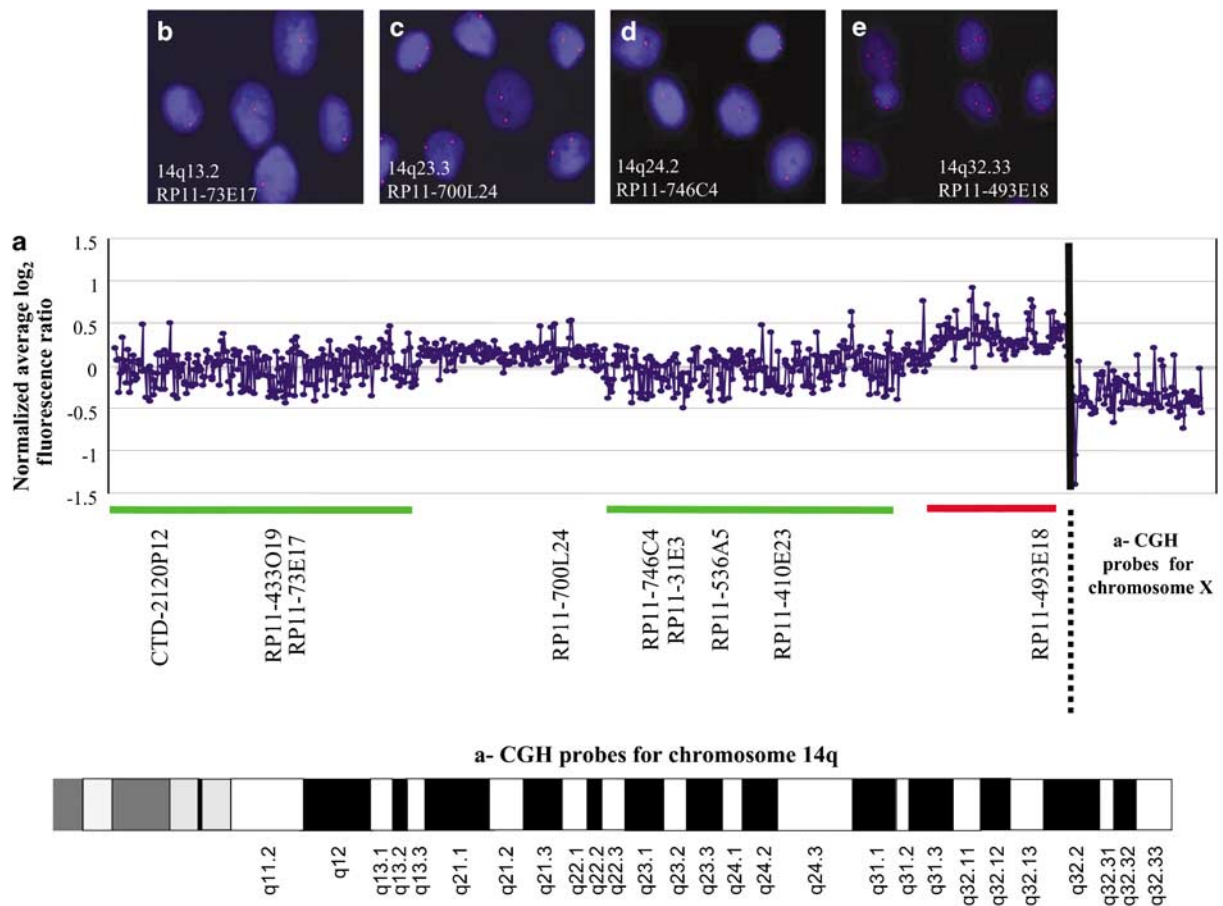


Figure 3 Ideogram of chromosome 14q from a meningioma tumour (case 9) where green and red lines highlight the deleted and gained chromosome regions as detected by a-CGH, respectively (a) and confirmatory iFISH results (b–e). As illustrated, a-CGH from this tumour showed losses at 14q11.2–q21.2 and 14q24.1–q32.12 (a); a single iFISH signal consistent with chromosome 14 deletion was also detected for both chromosome 14q regions with the RP11-73E17 (14q13.2) and RP11-746C4 (14q24.2) BAC clone FISH probes (b and d, respectively). In turn, the RP11-700L24 (14q23.3) BAC clone (c) displayed a normal diploid iFISH pattern, while the RP11-493E18 BAC clone (e) was associated with three and four hybridization signals, indicating the existence of an increased number of copies in the 14q32.33 region, in line with what was observed by a-CGH (a). Other smaller losses were interpreted as being potentially associated with copy number variation.

tion, in addition to a DNA pool of PB cells from healthy individuals, further contributed to decrease the potential occurrence of either false-positive or false-negative results due to the differences in tumour and reference DNA.

Overall, a high degree of agreement was observed for the meningioma tumours analysed between a-CGH and iFISH results, with a commercially available probe identifying the IGH gene locus at chromosome 14q32.3. However, it should be noted that the use of a-CGH and confirmatory iFISH assays with some of the a-CGH probes used allowed a more detailed definition of the abnormalities identified, additional alterations being detected in a few meningiomas. Of note, chromosome 14q abnormalities could be confirmed by a-CGH even in cases where these alterations were present in as low as between 20–30% of all cells in the sample, as counted by iFISH. Recently, a similar chromosome 14 tiling-path a-CGH has been applied to the study of

a series of gastrointestinal stromal tumours (GISTs) with a comparable sensitivity, allowing for the unequivocal detection of genomic changes present in samples with $\geq 40\%$ tumour cells.²⁹ Overall, high-resolution a-CGH confirmed that the most characteristic alteration of chromosome 14 in meningioma tumour is the entire loss of this chromosome. Interestingly, in addition to those cases showing monosomy 14 by iFISH, an a-CGH profile consistent with monosomy 14 was also detected in a patient showing two FISH signals per nuclei with both the 14q32.3 probe and the BAC clones tested. Such apparent discrepancy could be due to the occurrence of tetraploidization of an already undetectable tumour cell clone carrying monosomy 14, as in this tumour, a tetraploid profile was observed by iFISH for all chromosomes other than chromosome 14 (data not shown), suggesting the hemizygous nature of this chromosome.

Discrepant a-CGH vs iFISH profiles were detected in another two cases. In one patient, an apparently diploid DNA content was detected for all chromosome 14q BAC clones by a-CGH; however, iFISH analyses of the tumour cells with the same BAC probes confirmed the presence of four copies of chromosome 14q in the context of a tetraploid karyotype. At present, it is well known that polyploidy affects the assessment of DNA copy number by a-CGH;^{18,21} because of this, in such cases, a-CGH results should be corrected based on the results found with other techniques such as karyotyping and FISH.²¹ In the second discrepant case, coexisting gains and losses of different chromosome 14q regions were detected by a-CGH. Coexistence of regional losses and gains of genetic material of chromosome 14q may reflect the occurrence of complex structural abnormalities involving different regions of this chromosome. This hypothesis would be supported by the length of the aberrations encountered in this tumour, which affected hundreds of clones containing a relatively high number of genes. In line with this, previous studies have shown the occurrence of structural abnormalities of chromosome 14 in a small proportion of all meningiomas^{25,30–35} such alterations consisting of translocations involving chromosome 14 and several other different chromosomes, particularly chromosomes 1 and 22^{25,32–35}. Unfortunately, in this study, we could not confirm the exact underlying chromosome changes present in this patient (nuc ish Xcen(DXZ1x1), Ycen(DYZ3x1), 1p36(D1Z2x1), 1cen(D1Z5x3), 7cen(D7Z1x2), 9q34(ABLx2), 10cen(D10Z1x2), 11q13(CCND1x2), 14q32.3(IGHx3), 15q22(PMLx3), 17q12–q21(RARAx2), 18q21(BCL2x4) and 22q11.2(BCRx1)).

From the clinical point of view, although a few number of recurrences had been observed at the end of the study, they were restricted to patients carrying the complete loss of chromosome 14. Recently, we have shown that meningioma patients with monosomy 14 and del(1p36), together with a larger tumour size, have a higher probability of relapsing during the first 2.5 years after diagnostic surgery.¹⁰ Interestingly, in our study, all except two cases with the complete loss of chromosome 14 also displayed del(1p36) in the ancestral tumour cell clone (Table 1) and these latter patients included the two cases who had relapsed. Previous studies^{1,11,36} have defined a few regions (eg, 14q24.3–q32.33 and 14q11.2) as critical regions in chromosome 14 where candidate genes involved in determining the clinical behaviour of meningiomas could be localized. In this study, we were not able to identify small interstitial deletions, mutations or epigenetic silencing phenomena involving these regions, in the series of patients analysed. However, further studies on larger tumour series might allow the identification of some few cases displaying partial deletions on chromosome 14, which would provide valuable information on the critical regions of this chromosome harbouring genes involved in the development and progression of meningiomas.

In summary, in this study, we report for the first time the high-resolution a-CGH profiles of chromosome 14q in meningiomas. Our results confirm that the complete loss of chromosome 14q is the most frequent alteration associated with this chromosome, while other abnormalities consisting of either gains of the entire chromosome or coexistence of complex gains and losses of different regions of chromosome 14q could be only sporadically detected.

Acknowledgements

This work has been partially supported by grants from Consejería de Sanidad (44-05) Junta de Castilla y León (Valladolid, Spain); Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS/FEDER 06/0312 and RTICC RD06/0020/0035 from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain) and Fundación MMA (Madrid, Spain). MD Taberero is supported by IECSCYL. AB Espinosa is supported by grant FI05/00266 from the Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain). Normal meningial samples were provided by the Banco de Tejidos Neurológicos de Navarra (Pamplona, Spain) by C Caballero and T Tuñón.

References

- Simon M, von Deimling A, Larson JJ *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.
- Weber RG, Bostrom J, Wolter M *et al*: Analysis of genomic alterations in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14719–14724.
- 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.
- 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.
- Taberero MD, Espinosa AB, Maillou A *et al*: Characterization of chromosome 14 abnormalities by interphase *in situ* hybridization and comparative genomic hybridization in 124 meningiomas: correlation with clinical, histopathologic, and prognostic features. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 744–751.
- Taberero MD, Espinosa AB, Maillou A *et al*: Patient gender is associated with distinct patterns of chromosomal abnormalities and sex chromosome linked gene-expression profiles in meningiomas. *Oncologist* 2007; 12: 1225–1236.
- Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP *et al*: Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 1997; 14: 611–616.
- Lamszus K, Kluge 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 meningial sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 110: 103–110.
- Maillou A, Orfao A, Sayagues JM *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.
- Maillou A, Orfao A, Espinosa AB *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.

- 11 Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR *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.
- 12 Pinkel D, Segraves R, Sudar D *et al*: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; **20**: 207–211.
- 13 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D *et al*: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818–821.
- 14 Arslantas A, Artan S, Oner U *et al*: Comparative genomic hybridization analysis of genomic alterations in benign, atypical and anaplastic meningiomas. *Acta Neurol Belg* 2002; **102**: 53–62.
- 15 Pelz AF, Klawunde P, Skalej M *et al*: Novel chromosomal aberrations in a recurrent malignant meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; **174**: 48–53.
- 16 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.
- 17 van Tilborg AA, Al Allak B, Velthuisen SC *et al*: Chromosomal instability in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 312–322.
- 18 Snijders AM, Nowak N, Segraves R *et al*: Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001; **29**: 263–264.
- 19 Cai WW, Mao JH, Chow CW, Damani S, Balmain A, Bradley A: Genome-wide detection of chromosomal imbalances in tumors using BAC microarrays. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 393–396.
- 20 Fiegler H, Carr P, Douglas EJ *et al*: DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **36**: 361–374.
- 21 Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G *et al*: Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**: 413–422.
- 22 Jones DT, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Plant K, Collins VP: Genomic analysis of pilocytic astrocytomas at 0.97 Mb resolution shows an increasing tendency toward chromosomal copy number change with age. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 1049–1058.
- 23 Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK *et al*: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; **36**: 299–303.
- 24 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD *et al*: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97–109.
- 25 Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R *et al*: Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **148**: 123–128.
- 26 Buckley PG, Jarbo C, Menzel U *et al*: Comprehensive DNA copy number profiling of meningioma using a chromosome 1 tiling path microarray identifies novel candidate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 2005; **65**: 2653–2661.
- 27 Nunes F, Shen Y, Niida Y *et al*: Inactivation patterns of NF2 and DAL-1/4.1B (EPB41L3) in sporadic meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **162**: 135–139.
- 28 Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G *et al*: Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007; **8**: 16.
- 29 Wozniak A, Sciot R, Guillou L *et al*: Array CGH analysis in primary gastrointestinal stromal tumors: cytogenetic profile correlates with anatomic site and tumor aggressiveness, irrespective of mutational status. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 261–276.
- 30 Albrecht S, Goodman JC, Rajagopalan S, Levy M, Cech DA, Cooley LD: Malignant meningioma in Gorlin's syndrome: cytogenetic and p53 gene analysis. Case report. *J Neurosurg* 1994; **81**: 466–471.
- 31 Henn W, Cremerius U, Heide G *et al*: Monosomy 1p is correlated with enhanced *in vivo* glucose metabolism in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **79**: 144–148.
- 32 Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H *et al*: Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas. A study of 189 tumors. *Ann Genet* 1998; **41**: 164–175.
- 33 Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O: A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* 2000; **88**: 440–453.
- 34 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. *Clin Neuropathol* 2000; **19**: 259–267.
- 35 Prowald A, Wemmer S, Biehl C *et al*: Interstitial loss and gain of sequences on chromosome 22 in meningiomas with normal karyotype. *Int J Oncol* 2005; **26**: 385–393.
- 36 Leone PE, Bello MJ, de Campos JM *et al*: NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 1999; **18**: 2231–2239.

IV. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las características citogenéticas de los meningiomas. Con ello, además de conocerse la frecuencia relativa de cada una de las anomalías detectadas, se han identificado asociaciones clínicas y pronósticas relevantes, confirmando la naturaleza heterogénea de los meningiomas, desde el punto de vista genético^{115,122}. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que, mediante el empleo de técnica de iFISH multicolor, podemos definir con mayor precisión las vías de evolución clonal identificables a nivel intratumoral en la mayor parte de los meningiomas¹⁰⁷. Con ello se ha demostrado que pese a la mayor frecuencia de cariotipos complejos en los que coexisten la del(1p) y la monosomía 14 en tumores histológicamente avanzados^{35,110,120,122,200}, estas alteraciones se detectan también en un porcentaje variable de meningiomas benignos/grado I^{103,108,198}. No obstante, en nuestro conocimiento, no existe ningún estudio en el que se analicen las vías de evolución clonal a nivel intratumoral en muestras pareadas de meningiomas primarios y sus recidivas, con el fin de establecer de forma clara la relación ontogénica y genética existente entre ambos tumores.

Desde el punto de vista pronóstico, aunque la alteración cromosómica más habitual en los meningiomas es la monosomía 22/22q⁸⁶⁻⁸⁹, las deleciones de los cromosomas 1p y 14q constituyen las alteraciones genéticas que muestran una asociación más clara con la progresión tumoral y la evolución de estos tumores^{34,35,65,110,122,124,132,151,198}. Además, algunos trabajos sugieren la existencia de una distribución desigual de éstas y otras anomalías cromosómicas en mujeres con meningioma con respecto a los pacientes varones^{65,67,91,113,122,198}, sin que en el momento de iniciar este trabajo existiera ningún estudio, en el que se definieran con precisión los patrones de alteraciones citogenéticas asociados al género de los pacientes, o se

identificaran las causas y los mecanismos responsables del predominio femenino de los meningiomas.

De forma similar, recientemente se ha demostrado que la combinación de las deleciones del cromosoma 14, el grado histológico y la edad del paciente, permiten identificar ya al diagnóstico, aquellos sujetos con mayor probabilidad de recidiva¹⁹⁸; sin embargo, hasta la fecha no se ha caracterizado en detalle esta alteración citogenética con el fin de definir las zonas de deleción con mayor impacto pronóstico. En parte, esto es debido a las limitaciones asociadas a las técnicas citogenéticas convencionales que, por su baja sensibilidad, no permiten detectar pequeñas deleciones de material genético. Con el desarrollo de técnicas de alta resolución como los “arrays” de CGH y los “microarrays” de expresión, hemos pasado a disponer de nuevas herramientas que por su alta sensibilidad facilitan la identificación y delimitación de regiones cromosómicas delecionadas, incluso cuando la alteración genética afecta a secuencias relativamente cortas de ADN^{77-80,82}.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo, centrado en el estudio de las alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas y su impacto en el comportamiento clínico y evolutivo del tumor, nos hemos propuesto tres objetivos concretos: 1) profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética de los tumores recurrentes y determinar la relación genética existente con el tumor primario, así como las implicaciones de la misma en el comportamiento clínico-biológico y evolutivo del tumor; 2) establecer los patrones de alteraciones genéticas y los perfiles de expresión génica asociados con el predominio femenino de los meningiomas y el comportamiento más agresivo de la enfermedad en los varones, y; 3) caracterizar a nivel genético las alteraciones numéricas del cromosoma 14 empleando técnicas de alta resolución, al objeto de poder definir con mayor precisión las anomalías genéticas concretas del

cromosoma 14 que determinan su asociación con un comportamiento clínico-biológico y un pronóstico adverso de la enfermedad.

A continuación discutiremos de forma general, aunque individualizada, los resultados obtenidos en relación con cada uno de estos objetivos, reflejo de lo descrito anteriormente en la sección de material, métodos y resultados de este trabajo doctoral.

4.1.- Relación entre el perfil genético de los meningiomas primarios y sus recidivas: implicaciones en el comportamiento clínico-biológico y evolutivo del tumor.

La recidiva representa la principal complicación clínica de los meningiomas ocurriendo en aproximadamente una cuarta parte de los pacientes en los que se ha realizado cirugía curativa³⁴⁻³⁷. Pese a que se han identificado factores que contribuyen a predecir la recidiva^{39,198,366}, su naturaleza continúa siendo objeto de discusión. Así, en la actualidad se cree que la recidiva tumoral que sigue a una resección quirúrgica completa del tumor, puede deberse a: a) la persistencia local de células tumorales con capacidad clonogénica debido a la diseminación de las mismas durante la cirugía, a microinvasión de los vasos linfáticos o a una resección microscópica incompleta del tumor y/o b) al desarrollo de un nuevo tumor, independiente del meningioma primario, como consecuencia de una predisposición genética incrementada y un ambiente favorable.

En nuestra serie, observamos una asociación significativa entre la localización tumoral y la supervivencia libre de recaída. Así, la mayoría de los meningiomas ventriculares recidivaron, mientras que de los meningiomas espinales estudiados, sólo se observó recurrencia en un paciente. Ante estos hallazgos, podríamos especular que

esta asociación podría deberse a que algunas localizaciones tumorales (p.ej. ventricular) podrían asociarse a mayor complejidad quirúrgica que otras (p.ej. espinal); no obstante, la mayoría de los tumores ventriculares analizados correspondían a meningiomas histológicamente malignos, que además presentaban características citogenéticas adversas, y un índice pronóstico de alto riesgo según la clasificación de Maillo et al¹⁹⁸; por el contrario, todos los meningiomas espinales excepto uno, correspondían a tumores histológicamente benignos con cariotipo diploide o asociado a monosomía aislada del cromosoma 22. En conjunto, estos hallazgos sugieren que las diferencias observadas en la tasa de recidiva de meningiomas con diferente localización, podrían deberse, al menos en nuestra serie, a las distintas características genéticas e histopatológicas de ambos grupos de tumores, más que a la mayor o menor dificultad quirúrgica relacionada con su localización.

En línea con observaciones previas de nuestro grupo^{107,198}, el empleo sistemático y combinado de sondas específicas de distintas regiones cromosómicas frecuentemente alteradas en los meningiomas, permitió la constatación, en la mayoría de los casos, de la presencia de varios clones de células tumorales genéticamente distintos dentro de un mismo tumor, siendo este hallazgo más frecuente en los tumores que recidivaron. El análisis de la distribución de los distintos clones celulares a lo largo del tejido tumoral reveló una distribución difusa en la mayoría de los casos estudiados, en contraposición con observaciones realizadas por otros autores¹⁹⁴. Sin embargo, en aquellos tumores en los que se detectó la presencia de una pequeña proporción de células tumorales tetraploides, y que característicamente muestran un mayor tamaño nuclear, éstas mostraban tendencia a predominar en áreas con menor densidad celular.

El análisis comparativo de las alteraciones genéticas observadas en los distintos clones de células neoplásicas presentes en el tumor primario y su correspondiente

recidiva, mostró, en la mayoría de los individuos analizados, exactamente los mismos clones de células tumorales al diagnóstico y en las sucesivas recidivas. Únicamente en 5 de los 25 casos estudiados observamos la aparición de nuevos clones de células tumorales. En estos casos, los nuevos clones estaban relacionados citogenéticamente con aquellos que se observaron en el tumor primario, mostrando la adquisición de una o más aberraciones cromosómicas; con menor frecuencia detectamos la desaparición, en la recidiva, de clones representativos de la lesión inicial. En conjunto, estos resultados demuestran una relación directa entre el tumor primario y la recidiva en prácticamente la totalidad de los pacientes con meningiomas recurrentes. En aquellos casos en los que se identificaron nuevas alteraciones cromosómicas en los meningiomas recidivantes, éstas se asociaban a patrones citogenéticos más complejos, en consonancia con la noción de que la progresión tumoral se relaciona con el acúmulo secuencial de un número creciente de anomalías genéticas, entre las que habitualmente se incluyen la del(1p) y la monosomía 14^{34,35,65,110,122,124,132,151,198}.

Por otra parte, al comparar el tumor inicial de aquellos individuos que no presentaron recidiva, respecto al de los pacientes que mostraron recurrencia, observamos en éstos últimos, una mayor proporción de casos con patrones citogenéticos complejos, asociados a un número de clones de células tumorales significativamente mayor. Estos resultados confirman los hallazgos de otros autores que demuestran que la presencia de alteraciones cromosómicas concretas, como la monosomía 14, la del(1p36) y la ganancia de un cromosoma 22, que suelen detectarse en el contexto de cariotipos complejos, se asocian con un comportamiento clínico más agresivo, reflejado por una mayor tasa de recidiva y una menor supervivencia libre de enfermedad^{35,58,65,110,193,198,211}, a diferencia de lo que ocurre en aquellos pacientes con

monosomía 22 aislada. Sin embargo, ninguna de las alteraciones detectadas pudo explicar por sí sola todas las recidivas.

Estudios previos han demostrado que el tamaño tumoral, la edad y marcadores citogenéticos como la del(1p36) y la monosomía 14, tanto cuando están presentes en el conjunto de todas las células tumorales –incluyendo el clon tumoral ancestral– como cuando se detectan únicamente en una fracción de éstas, son parámetros de gran utilidad en la estratificación pronóstica de los meningiomas histológicamente benignos^{35,103,108,110,124,128,131,150,152,198,200}. En el presente estudio, el análisis multivariante mostró que el índice pronóstico de Maillo et al¹⁹⁸ –basado en la edad, el grado tumoral y la presencia de monosomía 14– junto con el tamaño del tumor, constituían la mejor combinación de variables independientes para predecir la recidiva tumoral en meningiomas. En conjunto, estos resultados indican que los pacientes más jóvenes con tumores de mayor tamaño, características histológicas desfavorables y/o monosomía 14 son más propensos a desarrollar recidivas; según nuestros datos, éstas podrían deberse a la persistencia de células tumorales incluso después de una resección macroscópicamente completa del meningioma.

No obstante todo lo anterior, merece destacar que la información disponible en la literatura acerca del pronóstico de los pacientes con meningioma, se ha centrado habitualmente en la supervivencia libre de recaída a medio/largo plazo (a los 5 y 10 años, respectivamente)^{13-15,54,297}. Desde el punto de vista práctico, esto no favorece el establecimiento al diagnóstico de un sistema de estratificación pronóstica que ayude a identificar a aquellos pacientes con un mayor riesgo de recidiva a corto plazo, en los que sería además recomendable realizar un seguimiento más estrecho. Por este motivo, en la actualidad únicamente se realiza un seguimiento estrecho de aquellos pacientes con meningiomas atípicos o anaplásicos, que se conoce tienen una elevada probabilidad

de recidivar^{44,115,300}, de acuerdo también con nuestros hallazgos. Teniendo en cuenta que en números absolutos, las recidivas de meningiomas benignos son más frecuentes que las de los tumores atípicos o anaplásicos²⁹⁶⁻²⁹⁸, en el presente trabajo nos centramos en determinar cuál sería la mejor combinación de factores pronósticos que contribuyeran a predecir la recidiva precoz entre pacientes con tumores histológicamente benignos. En este sentido, tomamos como punto de referencia para considerar una recidiva como precoz, la supervivencia libre de enfermedad a los dos años y medio de la cirugía del tumor primario, ya que durante este periodo es en el que se producen alrededor de la mitad de las recidivas. En conjunto, nuestros resultados muestran que, a excepción de la edad, las variables clínicas y citogenéticas que habitualmente se asocian con la supervivencia libre de recidiva a medio y largo plazo, cuando se consideran conjuntamente todos los meningiomas^{14,35,124,160,200}, como es el caso del género, la localización y el tamaño tumoral, la del(1p36), y las pérdidas de los cromosomas 9, 10, 14 y 18, retenían su valor predictivo a corto plazo entre los meningiomas benignos. Además, comprobamos que mientras que, el número de clones identificados citogenéticamente en un tumor no mostraba un impacto significativo en la supervivencia libre de enfermedad a corto plazo, la coexistencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral representaba un potente factor pronóstico adverso para la detección de recidivas tempranas en pacientes con meningiomas histológicamente benignos. De hecho, esta variable citogenética constituía junto con el tamaño tumoral, la mejor combinación de factores pronósticos independientes para la identificación de aquellos pacientes con elevado riesgo de sufrir una recidiva precoz de la enfermedad. Estos hallazgos estarían de acuerdo con la frecuencia relativamente elevada de meningiomas en los que se constató la coexistencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral entre los tumores atípicos y anaplásicos,

sugiriendo un comportamiento más agresivo de los meningiomas portadores de estas alteraciones citogenéticas, independientemente del subtipo histopatológico.

Hasta la fecha, se han identificado varios genes supresores de tumor localizados en la región 1p32-p36 y que podrían explicar el comportamiento más agresivo de los meningiomas que presentan del(1p36). Entre ellos se incluyen los genes CDKN2C (p18^{INK4C}), p73, RAD45L y el gen que codifica para la fosfatasa alcalina^{112,367}. No obstante, hoy seguimos sin conocer el papel que pueden desempeñar estos genes en la patogénesis de los meningiomas. Respecto al cromosoma 14, no se ha identificado ningún gen supresor de tumor potencialmente implicado en determinar el comportamiento clínico de los meningiomas^{120,122}. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el gen NDRG2 localizado en 14q11.2 podría estar involucrado en la progresión tumoral ya que se halla infraexpresado por metilación en meningiomas anaplásicos²⁴³.

En resumen, nuestros resultados indican que independientemente de los genes implicados, la coexistencia de del(1p36) y monosomía 14 en el clon tumoral ancestral, confiere a los meningiomas histológicamente benignos un patrón único de invasión tisular y/o un potencial clonogénico que les hace clínicamente más agresivos a corto plazo que los demás tumores. Curiosamente, esto no parece estar relacionado con el índice proliferativo del tumor, ya que el porcentaje de células en fase de síntesis de ADN (fase S) o S+G2/mitosis no mostró un impacto pronóstico significativo sobre la supervivencia libre de recaída, ni a corto ni a largo plazo. Sin embargo, debido al pequeño número de recidivas ocurrido en términos absolutos en los primeros dos años y medio tras la cirugía, nuestros resultados requieren ser confirmados en series más amplias de pacientes con meningiomas benignos/grado I.

4.2.- Patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica en meningiomas de varones y de mujeres: implicación en el predominio femenino de estos tumores.

En general, los meningiomas muestran un claro predominio en mujeres respecto a los varones^{3,4,368}, aunque de acuerdo con nuestros hallazgos y los de otros autores, en éstos últimos la enfermedad muestra una mayor complejidad citogenética y agresividad clínica^{65,67,91,113,122,198}. En el presente trabajo, demostramos por primera vez la existencia de patrones citogenéticos y de perfiles de expresión génica diferentes entre los tumores de varones y mujeres con meningiomas. Especialmente interesante resultó la ausencia de diferencias entre varones y mujeres en el patrón de expresión de genes relacionados con las hormonas sexuales y sus receptores; más aún, no se observaron diferencias entre los tumores de individuos de sexo diferente en la expresión de ningún gen codificado en los cromosomas autosómicos. Por el contrario, todos aquellos genes que se encontraban expresados de forma diferencial entre tumores de hombres y mujeres, correspondían a genes codificados en los cromosomas sexuales, particularmente en el cromosoma Y. En conjunto, estos hechos sugieren la implicación de factores genéticos asociados a los cromosomas sexuales, presumiblemente independientes de las hormonas esteroideas, en el predominio femenino y el desarrollo de la enfermedad.

Hasta la fecha, todos los intentos encaminados a la identificación de distintos patrones de expresión de proteínas asociadas a las hormonas sexuales en varones frente a mujeres con meningiomas, han fracasado^{52,335,369}. Sin embargo, un análisis detallado de estos trabajos muestra que habitualmente se han centrado en el análisis de un número relativamente restringido de proteínas, ninguna de las cuales está codificada en los cromosomas sexuales. En nuestra serie, sólo 8 de los 12847 genes analizados mostraron

un patrón de expresión significativamente diferente en los tumores de varones respecto a los de las mujeres, sin que para ninguno de ellos se haya establecido una asociación con la expresión de hormonas esteroideas, receptores hormonales y/o genes implicados en su regulación. Por el contrario, estos 8 genes se localizaron en los cromosomas sexuales: dos en el cromosoma X (DDX3X, XIST) y seis en el cromosoma Y (RPS4Y1, DDX3Y, JARD1D1D, EIF1AY, USP9Y y CYorf15B). Mención especial merece el hecho de que en el análisis de clúster, junto con los meningiomas característicos de varones y mujeres, de acuerdo a sus perfiles de expresión génica, se identificó un tercer subgrupo de meningiomas donde se incluían mujeres con monosomía X y un hombre con nulisomía Y.

Un análisis más detallado de aquellos genes que mostraron una expresión diferencial entre varones y mujeres sugiere que, algunos de ellos podrían ser irrelevantes a la hora de intervenir de forma directa en el desarrollo de los meningiomas. Así, hoy se conoce que el gen XIST resulta esencial en la inactivación de uno de los dos cromosomas X presentes en células femeninas, induciendo el silenciamiento transcripcional de una de las dos copias del cromosoma X³⁷⁰. De forma similar, las mutaciones del gen USP9Y, miembro de la familia de peptidasas C19, se han relacionado con un síndrome poco frecuente asociado a infertilidad masculina³⁷¹. Por otra parte, se ha comprobado que ambos genes (XIST y USP9Y) se expresan de forma diferencial en células sanguíneas normales de varones y mujeres como en tejidos cerebrales de ratón³⁷²⁻³⁷⁴.

Respecto a los demás genes que muestran una expresión diferencial en nuestro estudio, hasta la fecha no se había referido su asociación con el género, en meningiomas. No obstante, el análisis de los resultados de estudios de expresión genómica depositados en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)

mostró que en tejido cerebral³⁷⁵, en células neoplásicas de pacientes con leucemia linfática crónica³⁷⁶ y en el tejido tumoral de pacientes con carcinoma renal³⁷⁷, a excepción del gen DDX3Y, todos los demás genes muestran también una expresión significativamente diferente en los tejidos normales y/o neoplásicos de varones, respecto a los de las mujeres. En contraposición con estos hallazgos, nuestros resultados no mostraron la existencia de diferencias significativas en los patrones de expresión de estos seis genes en células somáticas meníngeas normales de varones y mujeres, aunque el número de muestras analizadas fue limitado.

De acuerdo con resultados preliminares de nuestro grupo y de otros autores en meningiomas^{107,115} y otros tumores sólidos³⁷⁸⁻³⁸¹, además de observarse perfiles de expresión génica diferentes según el género, en el presente trabajo confirmamos también la presencia de distintos patrones de alteraciones genéticas en varones y mujeres. Así, mientras que el clon tumoral ancestral de aquellos meningiomas que ocurrían en mujeres mostraba una mayor frecuencia de monosomía 22 como única alteración citogenética y de ganancias de diferentes cromosomas, los meningiomas de pacientes varones se asociaban con la pérdida de otros cromosomas, diferentes del cromosoma 22 y cariotipos complejos; entre las alteraciones características del clon tumoral ancestral de meningiomas de varones se incluían la nulisomía Y, la monosomía 14 y la del(1p36). En conjunto, estos resultados apoyarían también, desde otra perspectiva, la existencia de diferentes vías citogenéticas de evolución clonal en pacientes con meningioma¹⁰⁷, proceso en el que podría estar implicado el género de los pacientes. Según las diferencias observadas en la frecuencia de las alteraciones cromosómica características de los varones respecto a las de las mujeres, podría especularse que la delección del gen NF2 en el cromosoma 22 o la alteración de la regulación de oncogenes como resultado de las ganancias cromosómicas observadas en

una pequeña proporción de casos, podrían tener un papel fundamental en el desarrollo de los meningiomas en las mujeres; en contrapartida, los genes supresores de tumor codificados en los cromosomas 1 y/o 14 podrían condicionar el desarrollo y la progresión de los meningiomas en varones^{35,120,152,295,382}. De acuerdo con esta hipótesis, estudios recientes³¹⁷ muestran que los tumores de localización espinal, que en nuestra serie se encontraban prácticamente restringidos a mujeres, presentaban patrones de expresión génica asociados a la presencia de monosomía 22 como única alteración presente en el clon tumoral ancestral. Además, estas diferencias citogenéticas podrían contribuir a explicar la mayor incidencia de meningiomas histológicamente malignos y tumores de mayor tamaño, entre los pacientes varones. No obstante, merece destacar que en nuestro estudio, no hemos encontrado una asociación clara entre los patrones de expresión génica en varones y mujeres, que pudiera estar relacionada con los diferentes patrones de alteración de cromosomas autosómicos. Esto podría ser debido a que con frecuencia, alteraciones citogenéticas como la del(1p36), únicamente están presentes en un pequeño porcentaje de todas las células del tumor^{107,110}, y en este estudio hemos analizado los patrones de expresión génica del conjunto de todas las células de la muestra tumoral, y no de forma individualizada para cada clon. Por ello, entendemos que se requiere de estudios adicionales en los que se investigue la posible relación existente entre los genes diferencialmente expresados entre varones y mujeres y las alteraciones genéticas características de cada uno de estos dos grupos de pacientes con meningioma.

En nuestro conocimiento, ningún estudio había analizado con anterioridad el impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas de forma individualizada en varones y mujeres. En este sentido, nuestros resultados muestran un peor pronóstico para las pérdidas de los cromosomas 10, 14 y 18 en varones, mientras que en las

mujeres las únicas alteraciones que se asociaron con una menor supervivencia libre de recaída, fueron las ganancias en los cromosomas 1q, 7, 9, 22 y X. En conjunto, estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que entre los varones el desarrollo y progresión de los meningiomas se asociaría a pérdidas de diferentes genes supresores de tumor, mientras que en las mujeres, la supervivencia libre de recidiva podría estar condicionada principalmente por una sobreexpresión de oncogenes, y particularmente de oncogenes codificados en los cromosomas 1q, 7, 9, 22 y X. En consonancia con esta hipótesis, nuestros resultados mostraron que la monosomía 14 y las ganancias del cromosoma 22 constituyen la mejor combinación de factores pronósticos independientes para predecir la supervivencia libre de recidiva en pacientes varones, mientras que la ganancia del cromosoma 9 sería el principal factor pronóstico de índole citogenética, entre las mujeres.

4.3.- Alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas y su impacto en las características clínico-biológicas y evolutivas de la enfermedad.

Como hemos referido anteriormente, en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo con el fin de identificar las alteraciones genéticas que podrían condicionar el comportamiento clínico-biológico y evolutivo de los meningiomas; con estos estudios se buscaba contribuir a distinguir al diagnóstico, entre aquellos pacientes que se curarán con la cirugía y los que tendrán un elevado riesgo de recidiva. Desde el punto de vista clínico, nuestros hallazgos, junto con los de otros autores^{110,198,200} indican que las pérdidas del cromosoma 14, especialmente cuando coexisten con la del(1p) en el clon tumoral ancestral, se asociarían con una menor supervivencia libre de enfermedad, independientemente de la histopatología tumoral. Por todo ello, la caracterización

detallada de las anomalías del cromosoma 14, incluyendo deleciones, pérdidas o reordenamientos estructurales de este cromosoma, se ha convertido en un objetivo prioritario del estudio citogenético de los meningiomas realizado en esta tesis doctoral. Hasta el momento de iniciar este trabajo, eran escasos los estudios en los que se han caracterizado en detalle las anomalías del cromosoma 14 en meningiomas.

En términos generales, y de acuerdo con estudios previos^{34,72,83,115,118,126,128,208,211}, en el presente trabajo, detectamos alteraciones del cromosoma 14 en aproximadamente la mitad de los casos estudiados, observándose dos patrones diferentes de pérdidas de secuencias genéticas del cromosoma 14 mediante iFISH: a) monosomía, y; b) deleciones intersticiales de diferentes regiones de 14q. En la mayoría de los casos que presentaban alteraciones del cromosoma 14, observamos pérdida completa de un cromosoma 14, mientras que las deleciones intersticiales a nivel de 14q31-q32 sólo se observaron en una pequeña proporción de casos. Las pérdidas totales de una copia del cromosoma 14 involucraron tanto a la región centromérica como a la telomérica a nivel de 14q. Por el contrario, en los dos casos que presentaban deleciones intersticiales, ambas regiones permanecían conservadas. Los estudios de CGH convencional confirmaron la existencia en ambos tumores de una deleción distal en el cromosoma 14, entre las regiones 14q31 y 14q32. Diversos autores^{120,131} han observado casos de meningiomas esporádicos con pérdida de heterocigosidad a nivel de 14q32.11 y 14q32.32, que a su vez mantenían un patrón de heterocigosidad a nivel de la región telomérica, al igual que ocurría en nuestros dos pacientes. Entre las regiones 14q31 y 14q32.3 se encuentra localizada una región cromosómica que contiene el gen que codifica para IgH, junto a los protooncogenes ELK-2, AKT y TCL-1. Estudios previos sugieren que la activación de estos protooncogenes por mutación o translocación, podría estar implicada en la transformación neoplásica de algunos tumores³⁸³⁻³⁸⁷. A

pesar de esto, nuestros resultados sugieren que los pacientes con deleciones intersticiales en 14q32 podrían tener un comportamiento clínico benigno en ausencia de recidiva, en contraposición con los casos que mostraban monosomía 14, en los que ésta se asoció a mayor agresividad clínica e histopatológica, como se discute más adelante.

Desde un punto de vista histológico, se ha referido de forma reiterada en la literatura que las pérdidas de 14q serían más frecuentes en meningiomas atípicos y anaplásicos^{91,108,110,124,198,200}; además, se ha sugerido que estas mismas pérdidas alélicas en meningiomas histológicamente benignos, podrían estar asociadas con tumores más agresivos y con mayor probabilidad de recidiva^{124,198,211}. En el presente trabajo, tres cuartas partes de los pacientes con meningioma y monosomía 14 tenían tumores histológicamente benignos, correspondiendo los demás pacientes a meningiomas atípicos. En contraposición con lo referido por Simon et al¹²⁴, una elevada proporción de todos los tumores benignos que mostraron pérdidas a nivel de 14q recidivaron; por el contrario, ninguno de los dos casos con deleción intersticial limitada a la región 14q31-q32, y que correspondían también a tumores histológicamente benignos, presentó recidiva. Aunque el número de casos con deleción intersticial a nivel de 14q31-q32 es limitado, nuestros resultados sugieren que, al contrario de lo que ocurre en los meningiomas con monosomía 14, estos casos podrían asociarse con subtipos benignos de meningiomas con buen pronóstico, en ausencia de recidiva tumoral. No obstante, dado el relativamente limitado número de meningiomas con deleciones intersticiales de 14q, son necesarias series más amplias de pacientes con deleción en esta región, para poder confirmar nuestros hallazgos.

En cuanto a los meningiomas que presentaron ganancias del cromosoma 14, a pesar de encontrar una mayor incidencia de casos histológicamente malignos, no observamos una asociación significativa de estas anomalías con el pronóstico de la

enfermedad. Estos hallazgos coinciden con las observaciones realizadas por Mertens et al³⁸⁸ que indican que, al igual que en otros tumores sólidos, la pérdida de segmentos cromosómicos podría ser más importante que su ganancia, en el desarrollo y progresión de los meningiomas.

Con el fin de alcanzar un conocimiento más detallado de las alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas, construimos un “array” de CGH que permitiese, respecto a las técnicas de iFISH y CGH convencional, una mayor resolución a la hora de caracterizar las pérdidas y ganancias de este cromosoma. La mayor resolución de esta técnica se asocia al desarrollo de miles de clones BAC que se solapan para cada región de interés y permiten el análisis de todo el cromosoma 14³⁸⁹. En nuestro conocimiento, este constituye el primer trabajo donde se ha aplicado un “array” de CGH de alta resolución para estudiar el cromosoma 14 en meningiomas. En conjunto, nuestros resultados muestran un elevado grado de acuerdo entre los hallazgos de los estudios de iFISH y los de “arrays” de CGH. Sin embargo, el uso combinado de estas dos técnicas, empleando para el análisis de iFISH sondas fluorescentes del propio “array” de CGH, nos ha permitido definir con mayor precisión las alteraciones detectadas. En este sentido, merece destacar que la técnica de “arrays” de CGH mostró una elevada sensibilidad al permitir caracterizar las alteraciones del cromosoma 14, incluso en casos donde la infiltración tumoral era tan sólo del 20-30%, de acuerdo con los resultados de un estudio reciente en una serie de tumores gastrointestinales³⁹⁰.

Como cabía esperar, los estudios con el “array” de CGH confirmaron que la alteración más común del cromosoma 14 en meningiomas, es la monosomía. Especial destaque merece el hecho de que algunos casos que habían sufrido una pérdida del cromosoma 14 seguida de tetraploidización, mostraban un número diploide de copias del cromosoma 14 por iFISH, mientras que otros tumores mostraron un perfil normal

de CGH asociado a cariotipo tetraploide; en estos últimos casos es necesario emplear otras técnicas complementarias como el cariotipo convencional o la FISH, para la identificación de las anomalías (ganancias) del cromosoma 14. Finalmente, los estudios basados en el “array” de CGH del cromosoma 14, resultaron claves a la hora de definir las alteraciones cuantitativas de diferentes regiones cromosómicas presentes en un pequeño grupo de pacientes con meningiomas y reordenamientos complejos del cromosoma 14. Estudios previos han demostrado la presencia de alteraciones estructurales en el cromosoma 14 en una pequeña proporción de pacientes con meningioma^{65,99,113,118,200,229,232}, consistiendo estas alteraciones en translocaciones del cromosoma 14 en las que se ven involucrados también otros cromosomas, como los cromosomas 1 y 22^{65,99,113,118,200}. Desafortunadamente, en este trabajo, aunque pudimos caracterizar en detalle las regiones del cromosoma 14 alteradas, los estudios de “arrays” de CGH no nos permitieron confirmar los cambios cromosómicos concretos (p. ej.: translocaciones) subyacentes a dichas alteraciones.

Desde el punto de vista citogenético, en la mayoría de los casos que presentaban monosomía 14, detectamos también la coexistencia de del(1p36) en el clon tumoral ancestral, incluyendo estos casos a todos los pacientes con alteraciones del cromosoma 14 que recidivaron. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren la existencia de anomalías puntuales (p. ej.: mutación) y/o alteraciones epigenéticas, que afecten a genes codificados en el cromosoma 14, de las células neoplásicas de meningiomas con monosomía 14, en los que podría estar la clave para entender la progresión tumoral y el comportamiento clínico más agresivo de este subgrupo de meningiomas. Especial interés tendrán aquellos genes del cromosoma 14 que muestren una interacción funcional con genes ubicados a nivel de las regiones delecionadas en el cromosoma 1p, en pacientes que simultáneamente muestren del(1p36) en el clon tumoral ancestral. En

este sentido, recientemente se ha sugerido que el gen NDRG2, localizado en 14q11.2, podría actuar como gen supresor tumoral y estar implicado en la progresión de estos tumores, al estar inactivado en meningiomas malignos²⁴³. No obstante, se trata de un hallazgo indirecto que requiere de confirmación en otras series. Por todo ello, siguen siendo necesarios estudios adicionales en pacientes con meningiomas que presentan monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral para intentar localizar el gen (o genes) supresor(es) de tumor concreto(s), directamente involucrado(s) en conferir un comportamiento clínico más agresivo a este subgrupo de pacientes.

V. CONCLUSIONES

En relación con el primer objetivo, centrado en determinar la relación genética existente en pacientes con meningiomas recurrentes entre el tumor primario y la recidiva, y establecer el impacto de las alteraciones cromosómicas detectadas en el comportamiento clínico-biológico y evolutivo del tumor:

1.- Nuestros resultados muestran una estrecha relación citogenética entre el meningioma primario y las subsiguientes recidivas que ocurren en pacientes sometidos a cirugía curativa, lo que sugiere que en la mayoría de los meningiomas, la recurrencia de la enfermedad podría deberse al recrecimiento del tumor primario por persistencia de cantidades mínimas de células neoplásicas residuales.

2.- Los pacientes con meningiomas histológicamente benignos o de grado I de gran tamaño, en los que coexiste la presencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral, son aquellos que presentan una probabilidad más elevada de recidivar de forma precoz tras cirugía curativa, lo que indica la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, encaminadas a establecer un tratamiento más efectivo, en este subgrupo de pacientes.

En relación al segundo objetivo, que perseguía analizar las posibles diferencias entre las alteraciones cromosómicas y los perfiles de expresión génica en meningiomas de varones y mujeres, y su posible implicación en el predominio femenino de estos tumores:

3.- Los meningiomas que ocurren en mujeres muestran diferentes patrones de alteraciones cromosómicas y perfiles de expresión génica respecto a los tumores de

varones. El hecho de que todos los genes que se encuentran diferencialmente expresados en ambos grupos de pacientes estén codificados en los cromosomas sexuales, apoya la hipótesis de que estos cromosomas podrían estar implicados en determinar el predominio femenino de los meningiomas y el diferente comportamiento de la enfermedad en ambos sexos.

En relación con el tercer objetivo, relacionado con el análisis detallado de las alteraciones del cromosoma 14 en meningiomas y su asociación con el comportamiento clínico-biológico y evolutivo de la enfermedad:

4.- La pérdida completa de un cromosoma 14 constituye la alteración genética más frecuente de este cromosoma, siendo otras anomalías, como las deleciones intersticiales y las ganancias del cromosoma 14, poco frecuentes.

5.- La asociación encontrada entre la coexistencia de monosomía 14 y del(1p36) en el clon tumoral ancestral y el comportamiento clínico de los meningiomas, sugiere la existencia de uno o más genes supresores tumorales en ambos cromosomas, cuya alteración conjunta podría ser clave a la hora de condicionar la evolución más agresiva de la enfermedad en este subgrupo de pacientes.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Gottfried ON, Gluf W, Quinones-Hinojosa A, Kan P, Schmidt MH: Spinal meningiomas: surgical management and outcome. *Neurosurg Focus* 2003; **14**: e2.
- 2 King AT, Sharr MM, Gullan RW, Bartlett JR: Spinal meningiomas: a 20-year review. *Br J Neurosurg* 1998; **12**: 521-526.
- 3 Longstreth WT, Jr., Dennis LK, McGuire VM, Drangsholt MT, Koepsell TD: Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer* 1993; **72**: 639-648.
- 4 Bondy M, Ligon BL: Epidemiology and etiology of intracranial meningiomas: a review. *J Neurooncol* 1996; **29**: 197-205.
- 5 Black PM: Meningiomas. *Neurosurgery* 1993; **32**: 643-657.
- 6 Rohringer M, Sutherland GR, Louw DF, Sima AA: Incidence and clinicopathological features of meningioma. *J Neurosurg* 1989; **71**: 665-672.
- 7 Gursan N, Gundogdu C, Albayrak A, Kabalar ME: Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Int J Neurosci* 2002; **112**: 463-470.
- 8 Wolfsberger S, Doostkam S, Boecher-Schwarz HG *et al*: Progesterone-receptor index in meningiomas: correlation with clinico-pathological parameters and review of the literature. *Neurosurg Rev* 2004; **27**: 238-245.
- 9 Ayerbe I, Ucelay I, Negrevergne M, Portmann D, Boussens J: [Electrocochleography and topographic diagnosis]. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1991; **42**: 385-392.
- 10 Domingo Z, Rowe G, Blamire AM, Cadoux-Hudson TA: Role of ischaemia in the genesis of oedema surrounding meningiomas assessed using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Br J Neurosurg* 1998; **12**: 414-418.
- 11 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD *et al*: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; **114**: 97-109.
- 12 Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW *et al*: The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; **61**: 215-225; discussion 226-219.
- 13 Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL: Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. *J Neurosurg* 1985; **62**: 18-24.
- 14 Mathiesen T, Lindquist C, Kihlstrom L, Karlsson B: Recurrence of cranial base meningiomas. *Neurosurgery* 1996; **39**: 2-7; discussion 8-9.
- 15 Ayerbe J, Lobato RD, de la Cruz J *et al*: Risk factors predicting recurrence in patients operated on for intracranial meningioma. A multivariate analysis. *Acta Neurochir (Wien)* 1999; **141**: 921-932.
- 16 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.
- 17 Enam SA, Abdulrauf S, Mehta B, Malik GM, Mahmood A: Metastasis in meningioma. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; **138**: 1172-1177; discussion 1177-1178.
- 18 Strimlan CV, Golembiewski RS, Celko DA, Fino GJ: Primary pulmonary meningioma. *Surg Neurol* 1988; **29**: 410-413.
- 19 Flynn SD, Yousem SA: Pulmonary meningiomas: a report of two cases. *Hum Pathol* 1991; **22**: 469-474.
- 20 Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Horai T, Tateishi R, Nakagawa H: Primary and metastatic pulmonary meningioma. *Cancer* 1991; **67**: 1412-1417.

- 21 Kaleem Z, Fitzpatrick MM, Ritter JH: Primary pulmonary meningioma. Report of a case and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 1997; **121**: 631-636.
- 22 Lockett L, Chiang V, Scully N: Primary pulmonary meningioma: report of a case and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1997; **21**: 453-460.
- 23 Falleni M, Roz E, Dessy E *et al*: Primary intrathoracic meningioma: histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of two cases. *Virchows Arch* 2001; **439**: 196-200.
- 24 Delgado-Lopez PD, Martin-Velasco V, Castilla-Diez JM *et al*: Metastatic meningioma to the eleventh dorsal vertebral body: total en bloc spondylectomy. Case report and review of the literature. *Neurocirugia (Astur)* 2006; **17**: 240-249.
- 25 Antinheimo J, Sankila R, Carpen O, Pukkala E, Sainio M, Jaaskelainen J: Population-based analysis of sporadic and type 2 neurofibromatosis-associated meningiomas and schwannomas. *Neurology* 2000; **54**: 71-76.
- 26 Hanemann CO: Magic but treatable? Tumours due to loss of merlin. *Brain* 2008; **131**: 606-615.
- 27 von Deimling A, Larson J, Wellenreuther R *et al*: Clonal origin of recurrent meningiomas. *Brain Pathol* 1999; **9**: 645-650.
- 28 Zhu JJ, Maruyama T, Jacoby LB *et al*: Clonal analysis of a case of multiple meningiomas using multiple molecular genetic approaches: pathology case report. *Neurosurgery* 1999; **45**: 409-416.
- 29 Larson JJ, Tew JM, Jr., Simon M, Menon AG: Evidence for clonal spread in the development of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 1995; **83**: 705-709.
- 30 Stangl AP, Wellenreuther R, Lenartz D *et al*: Clonality of multiple meningiomas. *J Neurosurg* 1997; **86**: 853-858.
- 31 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.
- 32 Dziuk TW, Woo S, Butler EB *et al*: Malignant meningioma: an indication for initial aggressive surgery and adjuvant radiotherapy. *J Neurooncol* 1998; **37**: 177-188.
- 33 Hug EB, Devries A, Thornton AF *et al*: Management of atypical and malignant meningiomas: role of high-dose, 3D-conformal radiation therapy. *J Neurooncol* 2000; **48**: 151-160.
- 34 Ketter R, Henn W, Niedermayer I *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.
- 35 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.
- 36 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.
- 37 Mihaila D, Jankowski M, Gutierrez JA *et al*: Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 4443-4451.
- 38 Naumann M, Meixensberger J: Factors influencing meningioma recurrence rate. *Acta Neurochir (Wien)* 1990; **107**: 108-111.

- 39 Ildan F, Erman T, Gocer AI *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.
- 40 Simpson D: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; **20**: 22-39.
- 41 Zulch K: Histologic Typing of Tumours of the Central Nervous System.: World Health Organization. Geneva, 1979.
- 42 Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol* 1993; **3**: 255-268.
- 43 Niedermayer I, Kolles H, Zang KD, Feiden W: Characterization of intermediate type (WHO "atypical") meningiomas. *Clin Neuropathol* 1996; **15**: 330-336.
- 44 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.
- 45 Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G: Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *Lancet Neurol* 2006; **5**: 1045-1054.
- 46 Schnitt SJ, Vogel H: Meningiomas. Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. *Am J Surg Pathol* 1986; **10**: 640-649.
- 47 Artlich A, Schmidt D: Immunohistochemical profile of meningiomas and their histological subtypes. *Hum Pathol* 1990; **21**: 843-849.
- 48 Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM: Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993; **53**: 1312-1316.
- 49 Verhagen A, Go KG, Visser GM, Blankenstein MA, Vaalburg W: The presence of progesterone receptors in arachnoid granulations and in the lining of arachnoid cysts: its relevance to expression of progesterone receptors in meningiomas. *Br J Neurosurg* 1995; **9**: 47-50.
- 50 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.
- 51 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.
- 52 Hsu DW, Efrid JT, Hedley-Whyte ET: Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 1997; **86**: 113-120.
- 53 Perry A, Cai DX, Scheithauer BW *et al*: Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 872-879.
- 54 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.
- 55 Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Lohse CM, Wollan PC: "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. *Cancer* 1999; **85**: 2046-2056.
- 56 Sanson M, Cornu P: Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 2000; **142**: 493-505.
- 57 Commins DL, Atkinson RD, Burnett ME: Review of meningioma histopathology. *Neurosurg Focus* 2007; **23**: E3.

- 58 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.
- 59 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.
- 60 Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A: Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol* 1986; **25**: 233-242.
- 61 Palma L, Celli P, Franco C, Cervoni L, Cantore G: Long-term prognosis for atypical and malignant meningiomas: a study of 71 surgical cases. *J Neurosurg* 1997; **86**: 793-800.
- 62 Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C: Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999; **9**: M57-60.
- 63 Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; **194**: 23-28.
- 64 Nowell PC: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 1986; **46**: 2203-2207.
- 65 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. *Clin Neuropathol* 2000; **19**: 259-267.
- 66 Collins VP, Nordenskjold M, Dumanski JP: The molecular genetics of meningiomas. *Brain Pathol* 1990; **1**: 19-24.
- 67 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.
- 68 Lopez-Gines C, Piquer J, Cerda-Nicolas M, Barcia-Salorio J, Barcia-Marino C: Meningiomas: karyotypes and histological patterns. *Clin Neuropathol* 1989; **8**: 130-133.
- 69 Zang KD: Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **6**: 249-274.
- 70 Arnoldus EP, Wolters LB, Voormolen JH *et al*: Interphase cytogenetics: a new tool for the study of genetic changes in brain tumors. *J Neurosurg* 1992; **76**: 997-1003.
- 71 Poulsgard L, Ronne M, Schroder HD: Cytogenetic studies of 19 meningiomas and their clinical significance. I. *Anticancer Res* 1989; **9**: 109-112.
- 72 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.
- 73 Katsuyama J, Papenhausen PR, Herz F, Gazivoda P, Hirano A, Koss LG: Chromosome abnormalities in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; **22**: 63-68.
- 74 Zankl H, Huwer H, Zang KD: Cytogenetic studies on the nucleolar organizer region [NOR] activity in meningioma cells with normal and hypodiploid karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; **6**: 47-53.
- 75 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D *et al*: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; **258**: 818-821.

- 76 Rutledge MH, Xie YG, Han FY *et al.*: Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **10**: 122-130.
- 77 Watson MA, Gutmann DH, Peterson K *et al.*: Molecular characterization of human meningiomas by gene expression profiling using high-density oligonucleotide microarrays. *Am J Pathol* 2002; **161**: 665-672.
- 78 Wrobel G, Roerig P, Kokocinski F *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.
- 79 Carvalho LH, Smirnov I, Baia GS *et al.*: Molecular signatures define two main classes of meningiomas. *Mol Cancer* 2007; **6**: 64.
- 80 Buckley PG, Jarbo C, Menzel U *et al.*: Comprehensive DNA copy number profiling of meningioma using a chromosome 1 tiling path microarray identifies novel candidate tumor suppressor loci. *Cancer Res* 2005; **65**: 2653-2661.
- 81 Hansson CM, Buckley PG, Grigelioniene G *et al.*: Comprehensive genetic and epigenetic analysis of sporadic meningioma for macro-mutations on 22q and micro-mutations within the NF2 locus. *BMC Genomics* 2007; **8**: 16.
- 82 Hansson K, Szuhai K, Knijnenburg J, van Haeringen A, de Pater J: Interstitial deletion of 6q without phenotypic effect. *Am J Med Genet A* 2007; **143**: 1354-1357.
- 83 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.
- 84 Kohno T, Yokota J: Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair (Amst)* 2006; **5**: 1273-1281.
- 85 Zang KD, Singer H: Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 1967; **216**: 84-85.
- 86 Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S *et al.*: Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 1994; **6**: 180-184.
- 87 Lekanne Deprez RH, Bianchi AB, Groen NA *et al.*: Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 1022-1029.
- 88 Merel P, Hoang-Xuan K, Sanson M *et al.*: Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; **13**: 211-216.
- 89 Lomas J, Bello MJ, Arjona D *et al.*: Genetic and epigenetic alteration of the NF2 gene in sporadic meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **42**: 314-319.
- 90 Rey JA, Bello MJ, de Campos JM *et al.*: Abnormalities of chromosome 22 in human brain tumors determined by combined cytogenetic and molecular genetic approaches. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **66**: 1-10.
- 91 Lekanne Deprez RH, Riegman PH, van Drunen E *et al.*: Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 224-235.
- 92 Dumanski JP, Carlbom E, Collins VP, Nordenskjold M: Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**: 9275-9279.

- 93 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.
- 94 Ng HK, Lau KM, Tse JY *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.
- 95 Meloni A, Morgan R, Bridge J, Erling MA, Lewin RJ, Sandberg AA: Cytogenetic findings in typical and atypical meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; **51**: 35-39.
- 96 Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J *et al*: Chromosome 22 heterozygosity is retained in most hyperdiploid and pseudodiploid meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; **66**: 117-119.
- 97 Griffin CA, Hruban RH, Long PP *et al*: Chromosome abnormalities in meningeal neoplasms: do they correlate with histology? *Cancer Genet Cytogenet* 1994; **78**: 46-52.
- 98 Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Perez-Bacete M, Barcia-Salorio JL, Llombart-Bosch A: [Meningiomas with disomy of chromosome 22: study of 9 cases]. *Med Clin (Barc)* 1998; **111**: 663-666.
- 99 Prowald A, Wemmert S, Biehl C *et al*: Interstitial loss and gain of sequences on chromosome 22 in meningiomas with normal karyotype. *Int J Oncol* 2005; **26**: 385-393.
- 100 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.
- 101 Gonzalez-Agosti C, Xu L, Pinney D *et al*: The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 1996; **13**: 1239-1247.
- 102 McClatchey AI, Giovannini M: Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes Dev* 2005; **19**: 2265-2277.
- 103 Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME *et al*: Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; **9**: 296-298.
- 104 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.
- 105 Lomas J, Bello MJ, Arjona D *et al*: Analysis of p73 gene in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **129**: 88-91.
- 106 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.
- 107 Sayagues JM, Taberner MD, Mailló A *et al*: Intratumoral patterns of clonal evolution in meningiomas as defined by multicolor interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): is there a relationship between histopathologically benign and atypical/anaplastic lesions? *J Mol Diagn* 2004; **6**: 316-325.
- 108 Tse JY, Ng HK, Lau KM, Lo KW, Poon WS, Huang DP: Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol* 1997; **28**: 779-785.
- 109 Leone PE, Bello MJ, Mendiola M *et al*: Allelic status of 1p, 14q, and 22q and NF2 gene mutations in sporadic schwannomas. *Int J Mol Med* 1998; **1**: 889-892.

- 110 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.
- 111 Buschges R, Bostrom J, Wolter M *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.
- 112 Bostrom J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M *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.
- 113 Zattara-Cannoni H, Gambarelli D, Dufour H *et al*: Contribution of cytogenetics and FISH in the diagnosis of meningiomas. A study of 189 tumors. *Ann Genet* 1998; **41**: 164-175.
- 114 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.
- 115 Sayagues JM, Tabernero MD, Mailló 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.
- 116 Seizinger BR, Martuza RL, Gusella JF: Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 1986; **322**: 644-647.
- 117 Rempel SA, Schwchheimer 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.
- 118 Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O: A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* 2000; **88**: 440-453.
- 119 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.
- 120 Leone PE, Bello MJ, de Campos JM *et al*: NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 1999; **18**: 2231-2239.
- 121 Foulds L: The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 1954; **14**: 327-339.
- 122 Weber RG, Bostrom J, Wolter M *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.
- 123 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.
- 124 Simon M, von Deimling A, Larson JJ *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.
- 125 Prempre T, Amornmarn R, Faillace WJ, Arce CA, Nguyen TQ: 1;19 translocation in human meningioma. *Cancer* 1993; **71**: 2306-2311.
- 126 Maltby EL, Ironside JW, Battersby RD: Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **31**: 199-210.

- 127 Buschges R, Ichimura K, Weber RG, Reifenberger G, Collins VP: Allelic gain and amplification on the long arm of chromosome 17 in anaplastic meningiomas. *Brain Pathol* 2002; **12**: 145-153.
- 128 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.
- 129 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.
- 130 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.
- 131 Menon AG, Rutter JL, von Sattel JP *et al*: Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative 'tumor progression' locus. *Oncogene* 1997; **14**: 611-616.
- 132 Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S *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.
- 133 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.
- 134 Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH *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.
- 135 Modha A, Gutin PH: Diagnosis and treatment of atypical and anaplastic meningiomas: a review. *Neurosurgery* 2005; **57**: 538-550; discussion 538-550.
- 136 Beerenwinkel N, Rahnenfuhrer J, Daumer M *et al*: Learning multiple evolutionary pathways from cross-sectional data. *J Comput Biol* 2005; **12**: 584-598.
- 137 Ketter R, Urbschat S, Henn W *et al*: Application of oncogenetic trees mixtures as a biostatistical model of the clonal cytogenetic evolution of meningiomas. *Int J Cancer* 2007; **121**: 1473-1480.
- 138 Kros J, de Greve K, van Tilborg A *et al*: NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J Pathol* 2001; **194**: 367-372.
- 139 Wellenreuther R, Kraus JA, Lenartz D *et al*: Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 1995; **146**: 827-832.
- 140 Evans JJ, Jeun SS, Lee JH *et al*: Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningotheial meningiomas. *J Neurosurg* 2001; **94**: 111-117.
- 141 Hitotsumatsu T, Iwaki T, Kitamoto T *et al*: Expression of neurofibromatosis 2 protein in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 1997; **93**: 225-232.
- 142 Hartmann C, Sieberns J, Gehlhaar C, Simon M, Paulus W, von Deimling A: NF2 mutations in secretory and other rare variants of meningiomas. *Brain Pathol* 2006; **16**: 15-19.
- 143 Steilen-Gimbel H, Niedermayer I, Feiden W *et al*: Unbalanced translocation t(1;3)(p12-13;q11) in meningiomas as the unique feature of chordoid differentiation. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; **26**: 270-272.

- 144 Ludwin SK, Rubinstein LJ, Russell DS: Papillary meningioma: a malignant variant of meningioma. *Cancer* 1975; **36**: 1363-1373.
- 145 Pasquier B, Gasnier F, Pasquier D, Keddari E, Morens A, Couderc P: Papillary meningioma. Clinicopathologic study of seven cases and review of the literature. *Cancer* 1986; **58**: 299-305.
- 146 Kepes JJ, Moral LA, Wilkinson SB, Abdullah A, Llena JF: Rhabdoid transformation of tumor cells in meningiomas: a histologic indication of increased proliferative activity: report of four cases. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 231-238.
- 147 Perry A, Scheithauer BW, Stafford SL, Abell-Aleff PC, Meyer FB: "Rhabdoid" meningioma: an aggressive variant. *Am J Surg Pathol* 1998; **22**: 1482-1490.
- 148 Gregory SG, Barlow KF, McLay KE *et al*: The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* 2006; **441**: 315-321.
- 149 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.
- 150 Muller P, Henn W, Niedermayer I *et al*: Deletion of chromosome 1p and loss of expression of alkaline phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 3569-3577.
- 151 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.
- 152 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.
- 153 Sulman EP, White PS, Brodeur GM: Genomic annotation of the meningioma tumor suppressor locus on chromosome 1p34. *Oncogene* 2004; **23**: 1014-1020.
- 154 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.
- 155 Korshunov A, Shishkina L, Golanov A: Immunohistochemical analysis of p16INK4a, p14ARF, p18INK4c, p21CIP1, p27KIP1 and p73 expression in 271 meningiomas correlation with tumor grade and clinical outcome. *Int J Cancer* 2003; **104**: 728-734.
- 156 Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H *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.
- 157 Bello MJ, Aminoso C, Lopez-Marin I *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.
- 158 Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T *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.
- 159 Mendiola M, Bello MJ, Alonso J *et al*: Search for mutations of the hRAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Mol Carcinog* 1999; **24**: 300-304.
- 160 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.

- 161 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.
- 162 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.
- 163 Piaskowski S, Rieske P, Szybka M *et al*: GADD45A and EPB41 as tumor suppressor genes in meningioma pathogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; **162**: 63-67.
- 164 Bouvier C, Liprandi A, Colin C *et al*: Lack of alkaline phosphatase activity predicts meningioma recurrence. *Am J Clin Pathol* 2005; **124**: 252-258.
- 165 Lomas J, Aminoso C, Gonzalez-Gomez P *et al*: Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **148**: 148-151.
- 166 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.
- 167 Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B *et al*: Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; **24**: 3-8.
- 168 Bostrom J, Cobbers JM, Wolter M *et al*: Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 1998; **58**: 29-33.
- 169 Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C: PTEN/MMAC1 in malignant melanoma and its importance for tumor progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **125**: 21-26.
- 170 Saal LH, Johansson P, Holm K *et al*: Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 7564-7569.
- 171 von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC *et al*: Comprehensive allelotyping and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 544-558.
- 172 Tse JY, Ng HK, Lo KW *et al*: Analysis of cell cycle regulators: p16INK4A, pRb, and CDK4 in low- and high-grade meningiomas. *Hum Pathol* 1998; **29**: 1200-1207.
- 173 Simon M, Park TW, Koster G *et al*: Alterations of INK4a(p16-p14ARF)/INK4b(p15) expression and telomerase activation in meningioma progression. *J Neurooncol* 2001; **55**: 149-158.
- 174 Al-Khalaf HH, Lach B, Allam A *et al*: Expression of survivin and p16(INK4a)/Cdk6/pRB proteins and induction of apoptosis in response to radiation and cisplatin in meningioma cells. *Brain Res* 2007.
- 175 Ruas M, Peters G: The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1378**: F115-177.
- 176 Liu MC, Gelmann EP: P53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. *Semin Oncol* 2002; **29**: 246-257.
- 177 Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M *et al*: Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain

- reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer* 1995; **64**: 223-228.
- 178 Scarpelli M, Mazzucchelli R, Colanzi P: Meningioma: the impact of new techniques for the diagnosis and prognosis. *Adv Clin Path* 1997; **1**: 149-153.
- 179 Verheijen FM, Sprong M, Kloosterman JM, Blaauw G, Thijssen JH, Blankenstein MA: TP53 mutations in human meningiomas. *Int J Biol Markers* 2002; **17**: 42-48.
- 180 Rieske P, Zakrzewska M, Biernat W, Bartkowiak J, Zimmermann A, Liberski PP: Atypical molecular background of glioblastoma and meningioma developed in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *J Neurooncol* 2005; **71**: 27-30.
- 181 Al-Khalaf HH, Lach B, Allam A, AlKhani A, Alrokayan SA, Aboussekhra A: The p53/p21 DNA damage-signaling pathway is defective in most meningioma cells. *J Neurooncol* 2007; **83**: 9-15.
- 182 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.
- 183 Couch FJ, Wang XY, Wu GJ, Qian J, Jenkins RB, James CD: Localization of PS6K to chromosomal region 17q23 and determination of its amplification in breast cancer. *Cancer Res* 1999; **59**: 1408-1411.
- 184 Surace EI, Lusic E, Haipok CA, Gutmann DH: Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression. *Ann Neurol* 2004; **56**: 295-298.
- 185 Kim JH, Lee SH, Cho KJ, Jang JJ, Hong SI, Lee JH: Enhanced expression of the c-myc protooncogene in human intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci* 1993; **8**: 68-72.
- 186 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.
- 187 Pecina-Slaus N, Nikuseva Martić T, Tomas D, Beros V, Zeljko M, Cupic H: Meningiomas exhibit loss of heterozygosity of the APC gene. *J Neurooncol* 2007.
- 188 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.
- 189 Kamei Y, Watanabe M, Nakayama T, Kanamaru K, Waga S, Shiraishi T: Prognostic significance of p53 and p21WAF1/CIP1 immunoreactivity and tumor micronecrosis for recurrence of meningiomas. *J Neurooncol* 2000; **46**: 205-213.
- 190 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.
- 191 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.
- 192 Garcia R, Bueno A, Castanon S *et al*: Study of the DNA content by flow cytometry and proliferation in 281 brain tumors. *Oncology* 1997; **54**: 112-117.
- 193 Maillo A, Diaz P, Sayagues JM *et al*: Gains of chromosome 22 by fluorescence in situ hybridization in the context of an hyperdiploid karyotype are associated

- with aggressive clinical features in meningioma patients. *Cancer* 2001; **92**: 377-385.
- 194 Pfisterer WK, Hank NC, Preul MC *et al*: Diagnostic and prognostic significance of genetic regional heterogeneity in meningiomas. *Neuro Oncol* 2004; **6**: 290-299.
- 195 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.
- 196 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.
- 197 Ketter R, Kim YJ, Storck S *et al*: Hyperdiploidy defines a distinct cytogenetic entity of meningiomas. *J Neurooncol* 2007; **83**: 213-221.
- 198 Maillo A, Orfao A, Sayagues JM *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.
- 199 Ketter R, Rahnenfuhrer J, Henn W *et al*: Correspondence of tumor localization with tumor recurrence and cytogenetic progression in meningiomas. *Neurosurgery* 2008; **62**: 61-69; discussion 69-70.
- 200 Lopez-Gines C, Cerda-Nicolas M, Gil-Benso R *et al*: Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; **148**: 123-128.
- 201 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* 2007.
- 202 Rahnenfuhrer J, Beerenwinkel N, Schulz WA *et al*: Estimating cancer survival and clinical outcome based on genetic tumor progression scores. *Bioinformatics* 2005; **21**: 2438-2446.
- 203 Brito-Babapulle V, Atkin NB: Break points in chromosome #1 abnormalities of 218 human neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 1981; **4**: 215-225.
- 204 Simon M, Park TW, Leuenroth S, Hans VH, Loning T, Schramm J: Telomerase activity and expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, in meningioma progression. *J Neurosurg* 2000; **92**: 832-840.
- 205 Leuraud P, Dezamis E, Aguirre-Cruz L *et al*: Prognostic value of allelic losses and telomerase activity in meningiomas. *J Neurosurg* 2004; **100**: 303-309.
- 206 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.
- 207 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.
- 208 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.
- 209 Casartelli C, Rogatto SR, Barbieri Neto J: Karyotypic evolution of human meningioma. Progression through malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; **40**: 33-45.

- 210 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.
- 211 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.
- 212 Heilig R, Eckenberg R, Petit JL *et al*: The DNA sequence and analysis of human chromosome 14. *Nature* 2003; **421**: 601-607.
- 213 Dunham I, Shimizu N, Roe BA *et al*: The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 1999; **402**: 489-495.
- 214 Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD *et al*: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; **405**: 311-319.
- 215 Deloukas P, Matthews LH, Ashurst J *et al*: The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* 2001; **414**: 865-871.
- 216 Filley CM, Rollins YD, Anderson CA *et al*: The genetics of very early onset Alzheimer disease. *Cogn Behav Neurol* 2007; **20**: 149-156.
- 217 Stevanin G, Paternotte C, Coutinho P *et al*: A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia (SPG32) on chromosome 14q12-q21. *Neurology* 2007; **68**: 1837-1840.
- 218 Vanier MT, Millat G: Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet* 2003; **64**: 269-281.
- 219 Eudy JD, Ma-Edmonds M, Yao SF *et al*: Isolation of a novel human homologue of the gene coding for echinoderm microtubule-associated protein (EMAP) from the Usher syndrome type 1a locus at 14q32. *Genomics* 1997; **43**: 104-106.
- 220 Suzuki T, Yokota J, Mugishima H *et al*: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 1989; **49**: 1095-1098.
- 221 Boghosian L, Dal Cin P, Turc-Carel C *et al*: Three possible cytogenetic subgroups of leiomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; **43**: 39-49.
- 222 Takayama H, Suzuki T, Mugishima H *et al*: Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene* 1992; **7**: 1185-1189.
- 223 Kovacs G: Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 1993; **62**: 89-124.
- 224 Young J, Leggett B, Ward M *et al*: Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14 occurs in advanced colorectal carcinomas. *Oncogene* 1993; **8**: 671-675.
- 225 Fujino T, Risinger JI, Collins NK *et al*: Allelotype of endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1994; **54**: 4294-4298.
- 226 Osborne RJ, Leech V: Polymerase chain reaction allelotyping of human ovarian cancer. *Br J Cancer* 1994; **69**: 429-438.
- 227 Chang WY, Cairns P, Schoenberg MP, Polascik TJ, Sidransky D: Novel suppressor loci on chromosome 14q in primary bladder cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 3246-3249.
- 228 Bandera CA, Takahashi H, Behbakht K *et al*: Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 513-515.
- 229 Henn W, Cremerius U, Heide G *et al*: Monosomy 1p is correlated with enhanced in vivo glucose metabolism in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; **79**: 144-148.

- 230 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.
- 231 van Tilborg AA, Al Allak B, Velthuisen SC *et al*: Chromosomal instability in meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; **64**: 312-322.
- 232 Albrecht S, Goodman JC, Rajagopalan S, Levy M, Cech DA, Cooley LD: Malignant meningioma in Gorlin's syndrome: cytogenetic and p53 gene analysis. Case report. *J Neurosurg* 1994; **81**: 466-471.
- 233 Gebhart E, Bruderlein S, Augustus M, Siebert E, Feldner J, Schmidt W: Cytogenetic studies on human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1986; **8**: 125-138.
- 234 Atkin NB, Baker MC, Fox MF: Chromosome changes in 43 carcinomas of the cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **44**: 229-241.
- 235 Bigner SH, Friedman HS, Biegel JA *et al*: Specific chromosomal abnormalities characterize four established cell lines derived from malignant human gliomas. *Acta Neuropathol* 1986; **72**: 86-97.
- 236 Chaum E, Ellsworth RM, Abramson DH, Haik BG, Kitchin FD, Chaganti RS: Cytogenetic analysis of retinoblastoma: evidence for multifocal origin and in vivo gene amplification. *Cytogenet Cell Genet* 1984; **38**: 82-91.
- 237 Pedersen MI, Wang N: Chromosomal evolution in the progression and metastasis of human malignant melanoma. A multiple lesion study. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; **41**: 185-201.
- 238 Go Y, Ohjimi Y, Iwasaki H *et al*: A case of papillary meningioma with a t(1;4)(q44;q21). *Cancer Genet Cytogenet* 2000; **119**: 37-41.
- 239 Rajcan-Separovic E, Maguire J, Loukianova T, Nisha M, Kalousek D: Loss of 1p and 7p in radiation-induced meningiomas identified by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **144**: 6-11.
- 240 Perry A, Giannini C, Raghavan R *et al*: Aggressive phenotypic and genotypic features in pediatric and NF2-associated meningiomas: a clinicopathologic study of 53 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 994-1003.
- 241 Rajaram V, Brat DJ, Perry A: Anaplastic meningioma versus meningeal hemangiopericytoma: immunohistochemical and genetic markers. *Hum Pathol* 2004; **35**: 1413-1418.
- 242 Lee JY, Finkelstein S, Hamilton RL, Rekha R, King JT, Jr., Omalu B: Loss of heterozygosity analysis of benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Neurosurgery* 2004; **55**: 1163-1173.
- 243 Lusic EA, Watson MA, Chicoine MR *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.
- 244 Deng Y, Yao L, Chau L *et al*: N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer* 2003; **106**: 342-347.
- 245 Choi SC, Kim KD, Kim JT *et al*: Expression and regulation of NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) during the differentiation of dendritic cells. *FEBS Lett* 2003; **553**: 413-418.
- 246 Wu GQ, Liu XP, Wang LF *et al*: [Induction of apoptosis of HepG2 cells by NDRG2]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2003; **19**: 357-360.
- 247 Mitchelmore C, Buchmann-Moller S, Rask L, West MJ, Troncoso JC, Jensen NA: NDRG2: a novel Alzheimer's disease associated protein. *Neurobiol Dis* 2004; **16**: 48-58.

- 248 Bharadwaj R, Yu H: The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* 2004; **23**: 2016-2027.
- 249 Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S: DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008; **10**: 891-937.
- 250 Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M: Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1997; **12**: 133-140.
- 251 Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ: Cohesin is dispensable for centromere cohesion in human cells. *PLoS ONE* 2007; **2**: e318.
- 252 Bailis JM, Forsburg SL: It's all in the timing: linking S phase to chromatin structure and chromosome dynamics. *Cell Cycle* 2003; **2**: 303-306.
- 253 Nakayama KI, Nakayama K: Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 369-381.
- 254 Taylor SS, Scott MI, Holland AJ: The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res* 2004; **12**: 599-616.
- 255 Murray AW: Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 2004; **116**: 221-234.
- 256 Diaz-Martinez LA, Gimenez-Abian JF, Clarke DJ: Regulation of centromeric cohesion by sororin independently of the APC/C. *Cell Cycle* 2007; **6**: 714-724.
- 257 Schar P: Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer--when DNA replication escapes control. *Cell* 2001; **104**: 329-332.
- 258 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643-649.
- 259 Volkmer E, Karnitz LM: Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem* 1999; **274**: 567-570.
- 260 Spagnolo L, Rivera-Calzada A, Pearl LH, Llorca O: Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell* 2006; **22**: 511-519.
- 261 Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH: The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 845-854.
- 262 D'Amours D, Jackson SP: The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 317-327.
- 263 Valerie K, Povirk LF: Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 2003; **22**: 5792-5812.
- 264 Wyman C, Kanaar R: DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 2006; **40**: 363-383.
- 265 Raynard S, Bussen W, Sung P: A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* 2006; **281**: 13861-13864.
- 266 Liu Y, Masson JY, Shah R, O'Regan P, West SC: RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* 2004; **303**: 243-246.
- 267 Mills KD, Ferguson DO, Alt FW: The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* 2003; **194**: 77-95.
- 268 Paulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH: When checkpoints fail. *Cell* 1997; **88**: 315-321.

- 269 Elledge SJ: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; **274**: 1664-1672.
- 270 Thompson LH, Schild D: Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mutat Res* 2001; **477**: 131-153.
- 271 Blackburn EH: Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; **106**: 661-673.
- 272 Cesare AJ, Reddel RR: Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 99-108.
- 273 Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH: Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 1997; **275**: 1478-1481.
- 274 Sprung CN, Afshar G, Chavez EA, Lansdorp P, Sabatier L, Murnane JP: Telomere instability in a human cancer cell line. *Mutat Res* 1999; **429**: 209-223.
- 275 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR *et al*: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011-2015.
- 276 Matulic M, Sopta M, Rubelj I: Telomere dynamics: the means to an end. *Cell Prolif* 2007; **40**: 462-474.
- 277 Chong L, van Steensel B, Broccoli D *et al*: A human telomeric protein. *Science* 1995; **270**: 1663-1667.
- 278 Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E: Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* 1997; **17**: 236-239.
- 279 de Lange T: Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; **19**: 2100-2110.
- 280 O'Connor MS, Safari A, Liu D, Qin J, Songyang Z: The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* 2004; **279**: 28585-28591.
- 281 Blasco MA: Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 611-622.
- 282 Hsiao SJ, Smith S: Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 2008; **90**: 83-92.
- 283 Smith S, de Lange T: Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000; **10**: 1299-1302.
- 284 Masutomi K, Yu EY, Khurts S *et al*: Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003; **114**: 241-253.
- 285 Dynek JN, Smith S: Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* 2004; **304**: 97-100.
- 286 Canudas S, Houghtaling BR, Kim JY, Dynek JN, Chang WG, Smith S: Protein requirements for sister telomere association in human cells. *Embo J* 2007; **26**: 4867-4878.
- 287 Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME: Incidence and origin of dicentric chromosomes in cultured meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; **35**: 55-60.
- 288 Vagner-Capodano AM, Grisoli F, Gambarelli D, Figarella D, Pellissier JF: Telomeric association of chromosomes in human meningiomas. *Ann Genet* 1992; **35**: 69-74.
- 289 Gisselsson D, Jonson T, Petersen A *et al*: Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 12683-12688.

- 290 Gisselsson D, Pettersson L, Hoglund M *et al*: Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 5357-5362.
- 291 Artandi SE, Chang S, Lee SL *et al*: Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; **406**: 641-645.
- 292 Artandi SE, DePinho RA: A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; **10**: 39-46.
- 293 Stark GR: Regulation and mechanisms of mammalian gene amplification. *Adv Cancer Res* 1993; **61**: 87-113.
- 294 Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Collado-Diaz M *et al*: [Meningioma: a model of cytogenetic evolution in tumoral initiation and progresion]. *Neurocirugia (Astur)* 2003; **14**: 517-525.
- 295 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.
- 296 Simoca I, Olarescu AA, Jipescu I, Lisievici M: Postoperative outcome of intracranial meningiomas; long-term prognosis. *Rom J Neurol Psychiatry* 1994; **32**: 237-251.
- 297 Adegbite AB, Khan MI, Paine KW, Tan LK: The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurosurg* 1983; **58**: 51-56.
- 298 Yao YT: Clinicopathologic analysis of 615 cases of meningioma with special reference to recurrence. *J Formos Med Assoc* 1994; **93**: 145-152.
- 299 Stafford SL, Perry A, Suman VJ *et al*: Primarily resected meningiomas: outcome and prognostic factors in 581 Mayo Clinic patients, 1978 through 1988. *Mayo Clin Proc* 1998; **73**: 936-942.
- 300 Mahmood A, Caccamo DV, Tomecek FJ, Malik GM: Atypical and malignant meningiomas: a clinicopathological review. *Neurosurgery* 1993; **33**: 955-963.
- 301 Schick U, Marquardt G, Lorenz R: Recurrence of benign spinal neoplasms. *Neurosurg Rev* 2001; **24**: 20-25.
- 302 Kalala JP, Caemaert J, De Ridder L: Primary resected meningiomas: relapses and proliferation markers. *In Vivo* 2004; **18**: 411-416.
- 303 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.
- 304 Strik HM, Strobelt I, Pietsch-Breitfeld B, Iglesias-Rozas JR, Will B, Meyermann R: The impact of progesterone receptor expression on relapse in the long-term clinical course of 93 benign meningiomas. *In Vivo* 2002; **16**: 265-270.
- 305 Nagashima G, Asai J, Suzuki R, Fujimoto T: Different distribution of c-myc and MIB-1 positive cells in malignant meningiomas with reference to TGFs, PDGF, and PgR expression. *Brain Tumor Pathol* 2001; **18**: 1-5.
- 306 Arai H, Beppu T, Wada T *et al*: Pathological analyses of early recurrence and malignant transformation in meningiomas. *Brain Tumor Pathol* 1998; **15**: 37-40.
- 307 Yamasaki F, Yoshioka H, Hama S, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Recurrence of meningiomas. *Cancer* 2000; **89**: 1102-1110.
- 308 Ho DM, Hsu CY, Ting LT, Chiang H: Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas: a proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. *Cancer* 2002; **94**: 1538-1547.

- 309 Ide M, Jimbo M, Kubo O, Yamamoto M, Takeyama E, Imanaga H: Peritumoral brain edema and cortical damage by meningioma. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; **60**: 369-372.
- 310 Bitzer M, Wockel L, Morgalla M *et al*: Peritumoural brain oedema in intracranial meningiomas: influence of tumour size, location and histology. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; **139**: 1136-1142.
- 311 DiMeco F, Li KW, Casali C *et al*: Meningiomas invading the superior sagittal sinus: surgical experience in 108 cases. *Neurosurgery* 2004; **55**: 1263-1272; discussion 1272-1264.
- 312 McCarthy BJ, Davis FG, Freels S *et al*: Factors associated with survival in patients with meningioma. *J Neurosurg* 1998; **88**: 831-839.
- 313 Kunishio K, Ohmoto T, Furuta T, Matsumoto K, Nishimoto A: Factors influencing the recurrence rate of intracranial meningiomas after surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1994; **34**: 81-85.
- 314 Khashab M: Aggressive meningeal tumors. *J Neurosurg* 1995; **83**: 379; author reply 379-380.
- 315 Mantle RE, Lach B, Delgado MR, Baesa S, Belanger G: Predicting the probability of meningioma recurrence based on the quantity of peritumoral brain edema on computerized tomography scanning. *J Neurosurg* 1999; **91**: 375-383.
- 316 Kamitani H, Masuzawa H, Kanazawa I, Kubo T: Recurrence of convexity meningiomas: tumor cells in the arachnoid membrane. *Surg Neurol* 2001; **56**: 228-235.
- 317 Sayagues JM, Taberner MD, Maillo A *et al*: Microarray-based analysis of spinal versus intracranial meningiomas: different clinical, biological, and genetic characteristics associated with distinct patterns of gene expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 445-454.
- 318 Steudel WI, Feld R, Henn W, Zang KD: Correlation between cytogenetic and clinical findings in 215 human meningiomas. *Acta Neurochir Suppl* 1996; **65**: 73-76.
- 319 Nakasu S, Nakasu Y, Nakajima M, Matsuda M, Handa J: Preoperative identification of meningiomas that are highly likely to recur. *J Neurosurg* 1999; **90**: 455-462.
- 320 Solero CL, Fornari M, Giombini S *et al*: Spinal meningiomas: review of 174 operated cases. *Neurosurgery* 1989; **25**: 153-160.
- 321 Mahmood A, Qureshi NH, Malik GM: Intracranial meningiomas: analysis of recurrence after surgical treatment. *Acta Neurochir (Wien)* 1994; **126**: 53-58.
- 322 Carroll RS, Brown M, Zhang J, DiRenzo J, Font De Mora J, Black PM: Expression of a subset of steroid receptor cofactors is associated with progesterone receptor expression in meningiomas. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3570-3575.
- 323 Bouillot P, Pellissier JF, Devictor B *et al*: Quantitative imaging of estrogen and progesterone receptors, estrogen-regulated protein, and growth fraction: immunocytochemical assays in 52 meningiomas. Correlation with clinical and morphological data. *J Neurosurg* 1994; **81**: 765-773.
- 324 Wahab M, Al-Azzawi F: Meningioma and hormonal influences. *Climacteric* 2003; **6**: 285-292.
- 325 Lee E, Grutsch J, Persky V, Glick R, Mendes J, Davis F: Association of meningioma with reproductive factors. *Int J Cancer* 2006; **119**: 1152-1157.

- 326 Smith JS, Quinones-Hinojosa A, Harmon-Smith M, Bollen AW, McDermott MW: Sex steroid and growth factor profile of a meningioma associated with pregnancy. *Can J Neurol Sci* 2005; **32**: 122-127.
- 327 Kanaan I, Jallu A, Kanaan H: Management Strategy for Meningioma in Pregnancy: A Clinical Study. *Skull Base* 2003; **13**: 197-203.
- 328 Isla A, Alvarez F, Gonzalez A, Garcia-Grande A, Perez-Alvarez M, Garcia-Blazquez M: Brain tumor and pregnancy. *Obstet Gynecol* 1997; **89**: 19-23.
- 329 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.
- 330 Bonito D, Giarelli L, Falconieri G, Bonifacio-Gori D, Tomasic G, Vielh P: Association of breast cancer and meningioma. Report of 12 new cases and review of the literature. *Pathol Res Pract* 1993; **189**: 399-404.
- 331 Kubo M, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T: Association of breast cancer with meningioma: report of a case and review of the literature. *Jpn J Clin Oncol* 2001; **31**: 510-513.
- 332 Custer BS, Koepsell TD, Mueller BA: The association between breast carcinoma and meningioma in women. *Cancer* 2002; **94**: 1626-1635.
- 333 Roser F, Nakamura M, Ritz R *et al*: Proliferation and progesterone receptor status in benign meningiomas are not age dependent. *Cancer* 2005; **104**: 598-601.
- 334 Rubinstein AB, Loven D, Geier A, Reichenthal E, Gadoth N: Hormone receptors in initially excised versus recurrent intracranial meningiomas. *J Neurosurg* 1994; **81**: 184-187.
- 335 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.
- 336 Maiuri F, Donzelli R, Mariniello G *et al*: Local versus diffuse recurrences of meningiomas: factors correlated to the extent of the recurrence. *Clin Neuropathol* 2008; **27**: 29-36.
- 337 Niiro M, Yatsushiro K, Nakamura K, Kawahara Y, Kuratsu J: Natural history of elderly patients with asymptomatic meningiomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; **68**: 25-28.
- 338 Nakamura M, Roser F, Michel J, Jacobs C, Samii M: The natural history of incidental meningiomas. *Neurosurgery* 2003; **53**: 62-70; discussion 70-61.
- 339 Kasuya H, Kubo O, Tanaka M, Amano K, Kato K, Hori T: Clinical and radiological features related to the growth potential of meningioma. *Neurosurg Rev* 2006; **29**: 293-296; discussion 296-297.
- 340 Wilson CB: Meningiomas: genetics, malignancy, and the role of radiation in induction and treatment. The Richard C. Schneider Lecture. *J Neurosurg* 1994; **81**: 666-675.
- 341 Younis GA, Sawaya R, DeMonte F, Hess KR, Albrecht S, Bruner JM: Aggressive meningeal tumors: review of a series. *J Neurosurg* 1995; **82**: 17-27.
- 342 Zhang H, Rodiger LA, Shen T, Miao J, Oudkerk M: Perfusion MR imaging for differentiation of benign and malignant meningiomas. *Neuroradiology* 2008.
- 343 Weindel K, Moringlane JR, Marme D, Weich HA: Detection and quantification of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in brain tumor tissue and cyst fluid: the key to angiogenesis? *Neurosurgery* 1994; **35**: 439-448; discussion 448-439.

- 344 Bitzer M, Opitz H, Popp J *et al*: Angiogenesis and brain oedema in intracranial meningiomas: influence of vascular endothelial growth factor. *Acta Neurochir (Wien)* 1998; **140**: 333-340.
- 345 Yoshioka H, Hama S, Taniguchi E, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Peritumoral brain edema associated with meningioma: influence of vascular endothelial growth factor expression and vascular blood supply. *Cancer* 1999; **85**: 936-944.
- 346 Gupta PK, Sastry Kolluri VR, Das S, Chandra Mouli BA, Narayana Swamy KS, Das BS: Recurrences in meningioma after surgery. *Acta Neurochir (Wien)* 1989; **100**: 104-107.
- 347 Figarella-Branger D, Bouvier-Labit C, Liprandi A, Pellissier JF: [Prognostic factors in meningiomas]. *Ann Pathol* 2000; **20**: 438-447.
- 348 Zentner J, Meyer B, Vieweg U, Herberhold C, Schramm J: Petroclival meningiomas: is radical resection always the best option? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; **62**: 341-345.
- 349 Black PM, Villavicencio AT, Rhouddou C, Loeffler JS: Aggressive surgery and focal radiation in the management of meningiomas of the skull base: preservation of function with maintenance of local control. *Acta Neurochir (Wien)* 2001; **143**: 555-562.
- 350 O'Sullivan MG, van Loveren HR, Tew JM, Jr.: The surgical resectability of meningiomas of the cavernous sinus. *Neurosurgery* 1997; **40**: 238-244; discussion 245-237.
- 351 Roberti F, Sekhar LN, Kalavakonda C, Wright DC: Posterior fossa meningiomas: surgical experience in 161 cases. *Surg Neurol* 2001; **56**: 8-20; discussion 20-21.
- 352 Duma CM, Lunsford LD, Kondziolka D, Harsh GRt, Flickinger JC: Stereotactic radiosurgery of cavernous sinus meningiomas as an addition or alternative to microsurgery. *Neurosurgery* 1993; **32**: 699-704; discussion 704-695.
- 353 Goldsmith BJ, Wara WM, Wilson CB, Larson DA: Postoperative irradiation for subtotally resected meningiomas. A retrospective analysis of 140 patients treated from 1967 to 1990. *J Neurosurg* 1994; **80**: 195-201.
- 354 Valentino V, Schinaia G, Raimondi AJ: The results of radiosurgical management of 72 middle fossa meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1993; **122**: 60-70.
- 355 Condra KS, Buatti JM, Mendenhall WM, Friedman WA, Marcus RB, Jr., Rhoton AL: Benign meningiomas: primary treatment selection affects survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; **39**: 427-436.
- 356 Chamberlain MC, Tsao-Wei DD, Groshen S: Temozolomide for treatment-resistant recurrent meningioma. *Neurology* 2004; **62**: 1210-1212.
- 357 Loven D, Hardoff R, Sever ZB *et al*: Non-resectable slow-growing meningiomas treated by hydroxyurea. *J Neurooncol* 2004; **67**: 221-226.
- 358 Spitz IM, Grunberg SM, Chabbert-Buffet N, Lindenberg T, Gelber H, Sitruk-Ware R: Management of patients receiving long-term treatment with mifepristone. *Fertil Steril* 2005; **84**: 1719-1726.
- 359 Grunberg SM, Weiss MH, Russell CA *et al*: Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Invest* 2006; **24**: 727-733.
- 360 Ragel BT, Gillespie DL, Kushnir V, Polevaya N, Kelly D, Jensen RL: Calcium channel antagonists augment hydroxyurea- and ru486-induced inhibition of meningioma growth in vivo and in vitro. *Neurosurgery* 2006; **59**: 1109-1120; discussion 1120-1101.

- 361 Borovich B, Doron Y: Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. *J Neurosurg* 1986; **64**: 58-63.
- 362 Borovich B, Doron Y, Braun J *et al*: Recurrence of intracranial meningiomas: the role played by regional multicentricity. Part 2: Clinical and radiological aspects. *J Neurosurg* 1986; **65**: 168-171.
- 363 Murata J, Sawamura Y, Saito H, Abe H: Resection of a recurrent parasagittal meningioma with cortical vein anastomosis: technical note. *Surg Neurol* 1997; **48**: 592-595; discussion 595-597.
- 364 Beks JW, de Windt HL: The recurrence of supratentorial meningiomas after surgery. *Acta Neurochir (Wien)* 1988; **95**: 3-5.
- 365 Bucy PC: Postoperative recurrence of meningiomas. *Surg Neurol* 1986; **25**: 515.
- 366 Matsuno A, Fujimaki T, Sasaki T *et al*: Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. *Acta Neuropathol* 1996; **91**: 504-510.
- 367 Leuraud P, Marie Y, Robin E *et al*: Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neurooncol* 2000; **50**: 207-213.
- 368 Lamszus K: Meningioma pathology, genetics, and biology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; **63**: 275-286.
- 369 Carroll RS: Androgen and progesterone receptors in meningiomas. *J Neurosurg* 1993; **79**: 635-636.
- 370 Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL *et al*: A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991; **349**: 38-44.
- 371 Foresta C, Ferlin A, Garolla A *et al*: High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998; **13**: 302-307.
- 372 Whitney AR, Diehn M, Popper SJ *et al*: Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 1896-1901.
- 373 Xu J, Burgoyne PS, Arnold AP: Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1409-1419.
- 374 Tang Y, Lu A, Ran R *et al*: Human blood genomics: distinct profiles for gender, age and neurofibromatosis type 1. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; **132**: 155-167.
- 375 Vawter MP, Evans S, Choudary P *et al*: Gender-specific gene expression in post-mortem human brain: localization to sex chromosomes. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**: 373-384.
- 376 Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S *et al*: Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol* 2004; **22**: 3937-3949.
- 377 Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, Christman MF: Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003; **3**: 31.
- 378 Ganesan S, Silver DP, Greenberg RA *et al*: BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002; **111**: 393-405.
- 379 Piao Z, Malkhosyan SR: Frequent loss Xq25 on the inactive X chromosome in primary breast carcinomas is associated with tumor grade and axillary lymph node metastasis. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **33**: 262-269.

- 380 Lachlan KL, Youings S, Costa T, Jacobs PA, Thomas NS: A clinical and molecular study of 26 females with Xp deletions with special emphasis on inherited deletions. *Hum Genet* 2006; **118**: 640-651.
- 381 Benoit MH, Hudson TJ, Maire G *et al*: Global analysis of chromosome X gene expression in primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells and epithelial ovarian cancer cell lines. *Int J Oncol* 2007; **30**: 5-17.
- 382 Logan JA, Seizinger BR, Atkins L, Martuza RL: Loss of the Y chromosome in meningiomas. A molecular genetic approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; **45**: 41-47.
- 383 Aoki M, Batista O, Bellacosa A, Tsiichlis P, Vogt PK: The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 14950-14955.
- 384 Harindranath N, Mills FC, Mitchell M, Meindl A, Max EE: The human elk-1 gene family: the functional gene and two processed pseudogenes embedded in the IgH locus. *Gene* 1998; **221**: 215-224.
- 385 Pekarsky Y, Koval A, Hallas C *et al*: Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 3028-3033.
- 386 Staal SP, Huebner K, Croce CM, Parsa NZ, Testa JR: The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* 1988; **2**: 96-98.
- 387 Virgilio L, Narducci MG, Isobe M *et al*: Identification of the TCL1 gene involved in T-cell malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 12530-12534.
- 388 Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F: Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 1997; **57**: 2765-2780.
- 389 Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK *et al*: A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; **36**: 299-303.
- 390 Wozniak A, Sciot R, Guillou L *et al*: Array CGH analysis in primary gastrointestinal stromal tumors: cytogenetic profile correlates with anatomic site and tumor aggressiveness, irrespective of mutational status. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 261-276.