

ASPECTOS Y APLICACIONES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Dr. Horacio Martinetto

.....

DEPARTAMENTO DE NEUROLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES NEUROLÓGICAS RAÚL CARREA. FLENI

DIRECCIÓN: FLENI, MONTAÑESES 2325. C1428AQQ. BUENOS AIRES // E-MAIL DE CONTACTO: hmartinetto@fleni.org.ar

●

RESUMEN

El desarrollo relativamente reciente de las herramientas que proporciona la Biología Molecular y la complejidad de los mecanismos de desarrollo tumoral han demorado la aplicación de este conjunto de técnicas en el campo de la Oncología. A pesar de estas limitaciones, las aplicaciones de la Biología Molecular en el área oncológica son crecientes.

En este artículo se hará una revisión de los mecanismos oncogénicos generales, lo que permitirá comprender la demora en el desarrollo de métodos moleculares con aplicación en este campo; además, utilizando como ejemplo los tumores gliales (que son los tumores más comunes en el sistema nervioso central) se dará un panorama de la metodología que se está utilizando en la actualidad y de las nuevas herramientas que están desarrollándose y que abren perspectivas muy alentadoras para la evolución de ambas disciplinas.

Palabras Clave: *Biología Molecular- Procesos Genéticos- Neoplasias del Sistema Nervioso- Glioma*

ABSTRACT

The relatively recent development of tools made available through molecular biology, as well as the complexity of tumor development mechanisms have delayed application of this group of technologies in the field of Oncology. In spite of these limitations, application of molecular biology techniques in oncology is growing rapidly.

This article reviews general oncogenic mechanisms, thus explaining the delay in the development of molecular methods applicable in this field; furthermore, and using glial tumors (the most common CNS tumors) as an example, an overview of current methods is presented as well as of new methods currently under development, both offering very promising perspectives for progress in both fields.

Key Words: *Molecular Biology- Genetic Processes- Nervous System Neoplasms- Glioma*

INTRODUCCIÓN

La biología molecular puede definirse como un conjunto de técnicas derivadas de los avances extraordinarios ocurridos en las ciencias biológicas en las últimas décadas. Su finalidad puede abarcar un abanico de aplicaciones tales como la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, la clonación de mamíferos superiores y el establecimiento de protocolos de terapia génica. En la figura 1 se observa un esquema de las posibles aplicaciones clínicas de la biología molecular tales como diagnóstico, prevención y terapia aplicada, muchas de las cuales ya son una realidad en la actualidad.

Ahora bien, pensar en oncología y relacionarla con la biología molecular parece una obviedad pero sin embargo, la contribución que ha hecho esta última en ese campo podría catalogarse como limitada. El motivo de esto puede explicarse por dos razones. Por un lado, la aparición de métodos moleculares aplicables a la escala clínica es reciente. Si se analiza la tabla 1, se pueden definir cuatro períodos en el desarrollo moderno de las ciencias biológicas: un período inicial que abarca la segunda mitad del siglo XIX y la primera del siglo XX, donde se establecieron las leyes fundamentales; un segundo período, entre 1950 y 1970, en el que se descubrieron los mecanismos moleculares básicos; un tercer período, entre 1971 y 1985, durante el cual se desarrollaron las técnicas moleculares y finalmente, un último período que se extiende hasta la actualidad, donde se llevó a cabo la aplicación del conocimiento acumulado a una escala sin precedentes, permitiendo el abordaje molecular de cuestiones clínicas. Como se ve, sólo en los últimos 15 ó 20 años, dicho abordaje molecular se aplica al estudio de tumores. Por el otro lado, la segunda razón, se debe buscar en el propio proceso de tumorigénesis, como se verá a continuación.

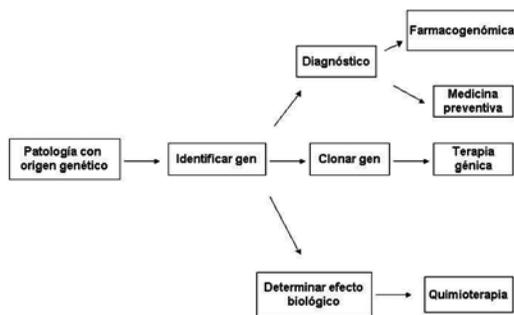


Figura 1. Aplicaciones clínicas de la biología molecular.

ONCOGÉNESIS

Los procesos oncogénicos pueden considerarse como alteraciones en la transducción de señales mitogénicas y su interacción con la maquinaria que gobierna el ciclo celular. Básicamente, este proceso puede interpretarse como un estímulo descontrolado de estas vías, independizado de la señal normal.

Las vías de transducción de señales externas en células eucarióticas son mecanismos cuidadosamente regulados, con un nivel de sofisticación sorprendente. Cualquier célula, hasta la más primitiva, debe ser capaz de captar e interpretar adecuadamente los estímulos que llegan desde su entorno para poder adaptarse a ellos satisfactoriamente. Los estímulos externos a los que está expuesta una bacteria son físicos o químicos (temperatura, presión osmótica, disponibilidad de nutrientes, etc). Para captar esas señales, las células procarióticas presentan sistemas de transducción relativamente simples conocidos como sistemas de dos componentes.

Tabla 1. Evolución histórica del conocimiento biológico moderno

1859	C. Darwin: El origen de las especies
1865	G. Mendel: Claves de la herencia (dominancia y recesividad)
1926	T. Hunt Morgan: Teoría del gen
1953	J. Watson-F. Crick: Estructura del ADN
1956	F. Crick: Dogma central (ADN-ARNm-Proteína)
1961	M. Nirenberg-H. Mathaei-S. Ochoa: Código genético
1972	P. Berg: Primer experimento de clonado
1974	P. Maxam-W. Gilbert, F. Sanger: Secuenciación del ADN
1975	G. Kohler-C. Milstein: Anticuerpos monoclonales
1975	E. Southern: Southern blot
1978	Genentech: Insulina recombinante
1980	K. Mullis: PCR
1981	Gordon-Ruddle: Primer ratón transgénico
1986	Applied Biosystems: Secuenciación automática de ADN
1990	Lanzamiento del proyecto Genoma Humano
1996	I. Wilmut: Primer mamífero clonado
2002	Celera Inc.: Secuencia completa del genoma humano

En la figura 2 se puede observar un esquema general de la organización de estos sistemas. Básicamente, el mecanismo consta de una proteína localizada en la membrana externa llamada sensor que recibe la señal externa y sufre una autofosforilación en histidina. Ese fosfato se transfiere a un residuo aspartato localizado en el segundo componente del sistema, una proteína llamada regulador que activa la transcripción en respuesta a la señal original. La fosfo-histidina y el fosfo-aspartato son compuestos de alta energía con una vida media corta, lo que implica que el sistema no requiere de un mecanismo específico para modular la duración de la activación.¹

Una célula bacteriana suele contar con una veintena de sistemas de dos componentes que le permiten decodificar apropiadamente las señales que provienen del exterior. Los sistemas de dos componentes son los moldes sobre los cuales evolucionaron los sistemas de transducción de señales eucarióticos.

El proceso evolutivo trajo aparejados cambios muy notorios en la organización intracelular (aparición de organelas, desarrollo de la membrana nuclear, etc.) y a su vez, en organismos multicelulares surgió la necesidad de coordinar la división y la actividad de células que forman parte de un mismo tejido. Como consecuencia de estos cambios, los procesos de transducción de señales también debieron evolucionar para poder cumplir sus funciones con exactitud y precisión.

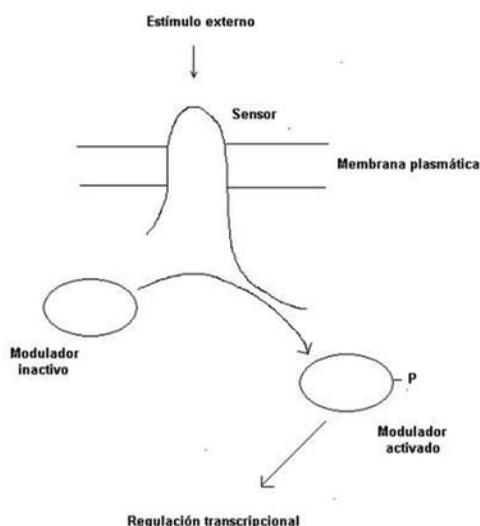


Figura 2. Transducción de señales en bacterias. Representación esquemática de un sistema de dos componentes.

En la figura 3 se observa un esquema extremadamente simplificado de una vía mitogénica eucariótica. A simple vista, al compararlo con el sistema bacteriano, se puede observar un incremento en el número de etapas necesarias para que la señal externa active la transcripción de genes específicos. Este proceso se puede dividir en tres etapas: inicial (que ocurre en la membrana), intermedia (que transcurre en el citosol) y final (que se desarrolla en el núcleo).² En la etapa inicial, el mitógeno externo se liga a su receptor induciendo la dimerización del mismo que, por medio de su **actividad** tirosina quinasa, se **activa** por transfosforilación. Una vez **activado**, el receptor **activa** al sistema RAS que a su vez permite translocar una serie de proteínas citosólicas a la cara interna de la membrana plasmática, donde son **activadas** por la fosforilación en tirosina mediada por el receptor. En este paso se produce una amplificación de la señal original ya que el estado activado del receptor tiene una duración tal que le permite interactuar con varios de sus blancos. La región intracitosólica del receptor funciona entonces como un anclaje para la formación de un complejo macromolecular compuesto por varias proteínas que van a iniciar a su vez la segunda etapa.³

En la etapa intermedia, se produce la activación de mecanismos citosólicos como por ejemplo el sistema de MAP quinastas; estos sistemas están constituidos por 3 proteínas con actividad de quinasa de Serina/Treonina que actúan secuencialmente; en el caso de la vía de la figura 3, el sistema está formado por RAF (activada en membrana por el receptor), MEK y ERK. El complejo requiere además la presencia de proteínas de andamiaje que

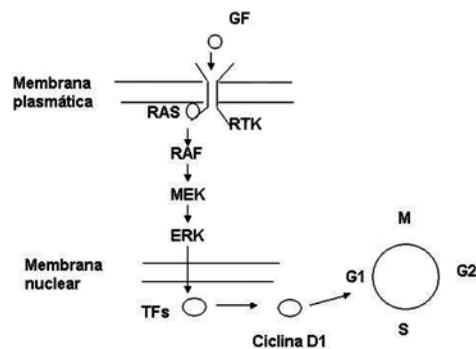


Figura 3. Transducción de señales en células eucarióticas. Representación esquemática de una vía mitogénica mediada por RAS y MAP quinastas. GF: Factor de crecimiento. RTK: Receptor de mitógenos con actividad de tirosina quinasa. TFs: Factores de transcripción.

garantizan la especificidad del proceso. La fosforilación de ERK por MEK permite su activación y la posibilidad de iniciar la última etapa.⁴

En la etapa final, ERK se transloca al núcleo donde fosforila diversos factores de transcripción, encargados de activar la expresión génica en respuesta a la señal original, desencadenando los procesos necesarios para la división celular, tales como inducción de la expresión de ciclinas que activan la transición G1-S del ciclo celular, reordenamiento del citoesqueleto para facilitar la citoquinesis, etc.⁵

Se puede apreciar cómo sobre el esquema primitivo de los sistemas de dos componentes se desarrollaron los mecanismos eucarióticos en los que se conservan los componentes extremos (el receptor de mitógenos es comparable al sensor y los factores de transcripción a los reguladores) pero aparecen una serie de elementos intermedios que permiten realizar el proceso correctamente. Además de los componentes ya mencionados, cada paso de activación es regulable por elementos capaces de inactivar (por ejemplo, fosfatasa que revierten la acción de las quinasas).

Es necesario considerar también que cada célula cuenta con numerosos receptores que activan diferentes vías, y estas vías pueden ser estimuladas en forma simultánea por las señales que provienen del entorno, ya sea matriz extracelular, como de células vecinas y aún de células lejanas. La sumatoria de todos los mecanismos de regulación enumerados refleja entonces la extrema complejidad del proceso mitogénico⁶ y por lo tanto, la dificultad de identificar cada componente, su función y sobre todo, el efecto de la alteración de su actividad.

Estimados estos aspectos básicos, es posible adentrarse en los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC). Dado que los gliomas malignos son el subtipo más común de tumores primarios del SNC, esta revisión se centrará en ellos como ejemplo de este tipo de patologías.

GLIOMAS

Los gliomas malignos son agresivos, altamente invasivos y destructivos⁷. Los gliomas han sido definidos patológicamente como tumores que pre-

sentan signos histológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales de diferenciación glial. Se los clasifica en tres grupos de acuerdo a su hipotética línea de diferenciación, es decir si presentan las características de las células astrocíticas, oligodendrocíticas o ependimales. Se desconoce el origen celular de estos tumores, habiéndose postulado que podrían ocurrir en células progenitoras o bien en células que sufrieron procesos desdiferenciativos que luego adquieren rasgos similares a alguno de los tres tipos celulares antes mencionados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido criterios para subclasificar estos tumores, agrupándolos en cuatro grados de malignidad creciente.⁸

Los oligodendrogliomas representan alrededor de un 5% de los tumores primarios de SNC, pero esta cifra es simplemente una estimación, ya que el refinamiento de los métodos de diagnóstico ha permitido calcular una incidencia mayor que la postulada hace unos años. Actualmente se estima que los oligodendrogliomas pueden representar alrededor del 30% de los tumores gliales⁹. La OMS ha establecido dos grados de clasificación para estos tumores: grado II, que presenta células diferenciadas y grado III, o anaplásicos que presentan características histológicas indicadoras de malignidad como alta celularidad, pleomorfismo celular, mitosis atípicas, proliferación microvascular y necrosis.⁸

Los oligodendrogliomas tienen la característica de ser muy sensibles a tratamientos quimioterápicos, diferente a lo que se ha observado en tumores astrocíticos.¹⁰

Dada esta diferencia en la sensibilidad a la quimioterapia, el diagnóstico diferencial es crucial para decidir la estrategia de tratamiento adecuada. Lamentablemente, la distinción entre tumores oligodendrogliales y astrocíticos por métodos anatomopatológicos e inmunohistoquímicos habituales presenta dificultades. Estas limitaciones de los métodos histológicos y patológicos llevó a que muchos investigadores buscaran marcadores genéticos que permitan definir el diagnóstico y establecer correlaciones pronósticas.¹¹

La alteración genética más común para ambos tipos de oligodendrogliomas es la delección alélica de 1p y 19q; se ha demostrado que alrededor del

80% de los oligodendrogliomas de grado II presentan pérdida de heterocigocidad (LOH) combinada en 1p y 19q, mientras que entre el 50% y el 70% de los de grado III presentan dicha alteración. Aún no se sabe cuáles de los genes que se pierden al deletarse estas regiones son importantes en el desarrollo del tumor, pero se sabe que la pérdida de 1p o la pérdida combinada de 1p y 19q tiene un gran poder predictivo de quimiosensibilidad.^{11,12}

Los oligodendrogliomas de grado II pueden mostrar, aunque en forma mucho menos frecuente, otras alteraciones como sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento (EGFR, PDGFRa, PDGFRb) e inactivación del gen CDKN2A (que codifica para el supresor de tumores p16) por hipermetilación de la región promotora.

La progresión al grado III se produce por acumulación de otras aberraciones genéticas, las más habituales son algunas vinculadas a inactivación de supresores de tumores como la delección homocigótica del gen CDKN2A la pérdida de heterocigocidad en 10q, asociada a la pérdida de dos supresores de tumores: PTEN y DMBT1 y mutaciones en el gen p53, y otras a la hiperactivación de vías proliferativas, siendo la más común la amplificación del gen EGFR.

Los astrocitomas son clasificados en 4 categorías: astrocitoma pilocítico (grado I), astrocitoma difuso (grado II), astrocitoma anaplásico (grado III) y glioblastoma multiforme (grado IV). Estos últimos se clasifican a su vez en secundarios (cuando la progresión ocurre a partir de un astrocitoma de menor grado) o de novo (cuando aparece originalmente). Si bien fenotípicamente son indistinguibles, presentan distintas alteraciones genéticas, por lo que se ha postulado que son dos entidades diferentes. Las alteraciones genómicas más frecuentes en astrocitomas son mutaciones en el gen p53 y en menor medida, pérdida de heterocigocidad en 19q y 10q salvo en glioblastomas de novo que suelen presentar amplificación del gen EGFR, delección homocigótica del gen CDKN2A (p16) y pérdida de heterocigocidad en 10q. Existen también tumores llamados gliomas mixtos u oligoastrocitomas que presentan características de ambas familias simultáneamente.⁸

Recientemente se ha informado que en los glioblastomas con inactivación del gen MGMT

por metilación de su promotor, la combinación de quimioterapia y radioterapia mejora la expectativa de vida de los pacientes.^{13,14} El producto del gen MGMT es una enzima que revierte el efecto de los agentes alquilantes (temozolamida, etc) usados clásicamente en quimioterapia y es por ello que su inactivación mejora la respuesta al tratamiento.^{15,16}

METODOLOGÍA ACTUAL Y EN DESARROLLO

Todas las alteraciones genéticas descritas en la sección anterior han sido identificadas por distintos métodos moleculares. En general, hay dos clases de métodos disponibles en la actualidad: los basados en técnicas de hibridación de sondas marcadas como hibridación fluorescente in situ (FISH) e hibridación genómica comparativa (CGH)^{17,18} y aquellos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea en su versión convencional usando oligonucleótidos marcados radiactivamente¹⁹ como por PCR en tiempo real, con la ventaja de permitir la cuantificación de los productos amplificados en la reacción.^{20, 21} En la figura 4, se observa un ejemplo de determinación de la amplificación del gen EGFR por PCR en tiempo real en un glioblastoma multiforme. Hay variantes de PCR que permiten detectar hipermetilación de promotores;^{22,23} la reacción de PCR puede acoplarse también a secuenciación directa en el caso de detección de mutaciones.

Más allá de estas herramientas, desde principios de este siglo se vienen desarrollando nuevas metodologías que están comenzando a ser utilizadas en el estudio de tumores cerebrales. Posiblemente sean los chips de ADN (DNA-microarrays) los más promisorios. Esta tecnología permite adquirir datos de expresión de todo el genoma en un único paso.²⁴ En la figura 5, se puede observar un estudio de oligodendrogliomas en donde las variaciones en la expresión de un grupo de genes permite diferenciar claramente las muestras que presentan una pérdida alélica en 1p-19q de las que no la presentan. De la misma manera, se pueden identificar genes que remarquen diferencias entre el grado del tumor, que agrupen las muestras de acuerdo al comportamiento frente a distintas terapias y establezcan evaluaciones pronósticas precisas.

Recientemente surgieron variantes de esta tecnología, una de ellas denominada CHIP-on-chip

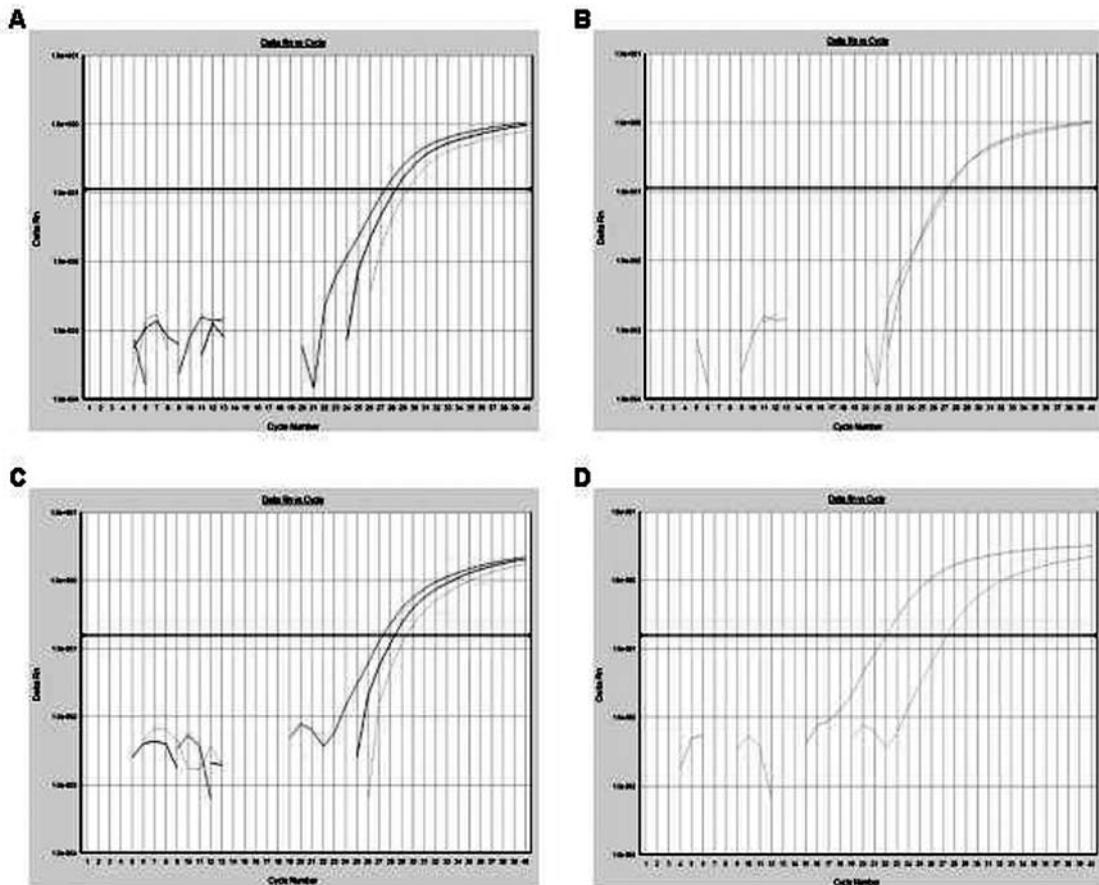
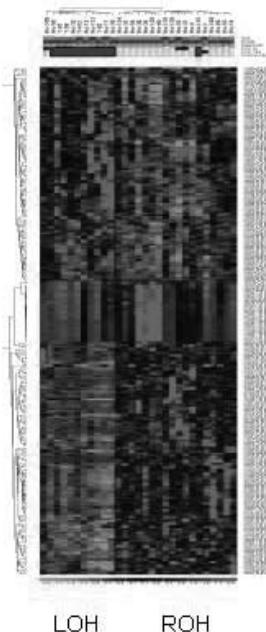


Figura 4. PCR en tiempo real. Ejemplo de detección de amplificación del gen EGFR
 A) Curva de calibración con 1, 2 y 4 ng del gen de referencia (GAPDH)
 B) Estimación de la masa de ADN de la muestra (comparable a 4 ng) por cuantificación del gen de referencia.
 C) Curva de calibración con 1, 2 y 4 ng del gen de interés (EGFR)
 D) Estimación de la masa de ADN del gen de interés (EGFR) en la muestra (mucho mayor a 4 ng) que indica amplificación del mismo.

Figura 5. Análisis de la expresión génica mediante chips de ADN. Ejemplo de análisis supervisado de oligodendrogliomas que presentan (LOH) o no (ROH) delección en 1p y 19q.



que permite analizar interacciones ADN-proteína y por lo tanto, la actividad de factores de transcripción y la remodelación de la cromatina. También es posible el análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), que permite determinar imbalances alélicos (pérdida o ganancia de regiones cromosómicas).

Otra área de gran desarrollo que está comenzando a aplicarse con fines diagnósticos es la espectroscopia de masa para realizar estudios transcriptómicos.^{25,26} La limitación que presenta esta técnica es la dificultad para identificar los péptidos visualizados en el ensayo, ya que para ello es necesario secuenciar los mismos (labor más dificultosa que la secuenciación de ADN) o bien revelarlos por medio de anticuerpos específicos. De todos modos, se están construyendo bases de datos con numerosos patrones proteómicos y con

la identificación de péptidos. Estas bases de datos muy probablemente permitan en el futuro paliar la limitación mencionada previamente.

PERSPECTIVAS

En la última década, la biología molecular se ha convertido en una herramienta accesible en el ámbito clínico para el estudio de los tumores del SNC. Dada la progresión geométrica observada en el uso de estas técnicas, es de esperar que en los próximos años se generalice su aplicación. Si además, tal como se especula actualmente, las nuevas metodologías (transcriptómica, proteómica, etc.) se suman al arsenal clínico disponible, indudablemente se llegará a la situación de poder caracterizar cada tumor en forma individual. Estas aplicaciones moleculares, sumadas a los métodos de imágenes moleculares basados en resonancia magnética (espectroscopia, difusión), van a permitir reflejar la heterogeneidad característica de los tumores del SNC algo que los métodos histológi-

cos e inmunohistoquímicos no permiten. Es probable que se diseñen chips de ADN específicos para distintas clases de tumores, en los que el análisis de las variaciones en la expresión de una fracción del genoma permita realizar una clasificación precisa del tumor, establecer su gradación, realizar un pronóstico de la evolución y sobre todo, determinar la terapia más efectiva para el tratamiento. De hecho, se están desarrollando proyectos multicéntricos, como el proyecto eTumour financiado por la Comunidad Económica Europea (www.etumour.net), cuyo fin es establecer una serie de clasificadores basados en datos transcriptómicos y de espectroscopía para diseñar esa clase de chips y establecer nuevas pautas de diagnóstico.

Para concluir, es muy posible que en el transcurso de los próximos años se asista al advenimiento de una nueva etapa de medicina personalizada basada en las metodologías descritas en este trabajo. Todo esto debería redundar en la optimización de las terapias y en avances en el conocimiento neuro-oncológico ●

REFERENCIAS

- Mascher, T, Helmann JD, Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006;70:910-938.
- Schaffer R, Scramme A, Tchernitsa OI, et al. Oncogenic signaling pathways and deregulated target genes. *Recent Results Cancer Res* 2007;176:7-24.
- McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK *Oncogene* 2007; 26:3113-3121.
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A, et al. Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1196-1212.
- Tashiro E, Tsuchiya A, Imoto M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* 2007; 98:629-635.
- Zhu X, Gerstein M, Snyder M. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev* 2007; 21:1010-1024.
- Maher D, Furnari F, Bachoo R, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001; 15:1311-1333
- Kleihues P, Cavenee WK. 2000 World Health Organization classification of tumors of the nervous system. IARC/WHO, Lyon.
- Perry JR. Oligodendrogliomas: clinical and genetic correlations *Curr Op Neurol* 2001;14:705-710.
- Fortin D, Cairncross GJ, Hammond RR. Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment. *Neurosurgery* 1999 45:1279-1291.
- Reifenberger G, Louis DN. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62:111-126.
- Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Can Res* 2001; 7:839-845.
- DeAngelis LM. Chemotherapy for brain tumors-A new beginning. *N Eng J Med* 2005; 352:1036-1038.
- Stupp R, Mason W, van den Bent M, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma *N Eng J Med* 2005;352:987-996.

- 15 Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Eng J Med* 2005; 352:997-1003.
- 16 Hegi M, Diserens A, Godard S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Can Res* 2004 ; 10:1871-1874.
- 17 Bouvier C, Roll P, Quilichini B, et al. Deletions of chromosomes 1p and 19q are detectable on frozen smears of gliomas by FISH: usefulness for stereotactic biopsies. *J Neurooncol* 2004; 68:141-149.
- 18 Cowell JK, Barnett GH, Nowak NJ. Characterization of the 1p/19q chromosomal loss in oligodendrogliomas using comparative genomic hybridization arrays (CGHa). *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63:151-8.
- 19 Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1473-1479.
- 20 Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG, et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2001; 158:1253-1262.
- 21 Berggren P, Kumar R, Sakano S, et al. Detecting homozygous deletions in the CDKN2A/p16 (INK4a)/p14 (ARF) gene in urinary bladder cancer using real-time PCR. *Clin Can Res* 2003; 9:235-242.
- 22 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-9826.
- 23 Palmisano W, Divine K, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Can Res* 2000;60:5954-5958.
- 24 Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF. DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:782-792.
- 25 Chaurand P, Schwartz SA, Reyzer ML, et al. Imaging mass spectrometry : principles and potentials. *Toxicol Pathol* 2005; 33:92-101.
- 26 Chaurand P, Sanders M, Jensen RA, et al. Proteomics in diagnostic pathology. Profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J. Pathol* 2004; 154:1057-1068.