

Sobreexpresión de p53 como factor pronóstico en niños con astrocitomas

p53 overexpression prognostic factor in children with astrocytoma

Enrique López-Aguilar,¹ Ana Carolina Sepúlveda-Vildósola,² Ana Paulina Rioscovián-Soto,¹ Lupita Mendoza-Galván,² Francisco García-Vázquez,³ Félix Ignacio,⁴ Hermilo De La Cruz-Yáñez⁵

▷ RESUMEN

Introducción: La sobrevida de pacientes con astrocitoma es de 56% a 60 meses. Es necesario identificar factores que influyen en el pronóstico. La expresión de la molécula p53, una proteína apoptótica que al presentar mutaciones en su estructura condicionan su sobreexpresión, alterando la regulación del ciclo celular y predisponiendo así a progresión, proliferación celular y desarrollo de neoplasias con alto grado de malignidad. El objetivo de este estudio fue determinar la asociación sobreexpresión de p53 con la sobrevida.

Métodos: Se incluyeron pacientes con diagnóstico de astrocitoma atendidos entre 1995 y 2009. Se realizó inmunohistoquímica, para determinar la expresión de p53, y se correlacionó con la histología tumoral y la sobrevida de los pacientes.

Resultados: Se incluyeron 35 pacientes. La sobrevida global fue de 56% a 10 años y la mediana de seguimiento de 32 meses (dos a 169 meses). Para la expresión de p53, 65.7% (23 pacientes) fueron negativos. La sobrevida para los pacientes que no sobreexpresaron p53 fue de 69.5% a 120 meses, contra 40% a 120 meses para aquellos con sobreexpresión de p53 ($p=0.21$, no significativa). El riesgo (OR) de desarrollar glioblastoma multiforme cuando existe sobreexpresión de la proteína p53 es de 4.4 (0.356 a 54.36).

▷ ABSTRACT

Background: Astrocytomas survival is less than 60% at five years in children. It is necessary to know better the biological behavior of these tumours and in this way to give a more appropriate treatment. p53 protein is an apoptotic protein and the dysregulation of this oncogene could result in immortality of tumour cells.

Methods: We included all patients with astrocytoma diagnosed between January 1995 to December 2009. Immunohistochemistry was realized and overexpression of p53 gene determined. Kaplan Meier curves survival and Log Rank Test was calculated in order to determine the association with histological grade and survival.

Results: 35 patients were included; the global survival for the entire group was 56% at 10 years (median follow up 32 months). According with the p53 over expression, these patient that overexpressed these gene, the survival at the same interval was 40% compared with 69.5% for the group of patients that not over expressed p53 ($p = 0.21$). It was not statistical significance.

Discussion: p53 is associated with a poor survival, in this group of patients however not statistical significance was found. But it is important that these patients with p53 overexpression were associated with more aggressive histology (OR: 4.1)

Keywords: Astrocytoma, p53, pediatric cancer, Mexico

1Departamento de Oncología Pediátrica.

2Departamento de Pediatría Médica.

3Departamento de Patología.

Instituto Nacional de Pediatría.

4Departamento de Patología.

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.

5Dirección General

UMAE Hospital de Pediatría CMN SXXI, IMSS

Correspondencia: Dr. Enrique López Aguilar. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc, CP 01620. México, D. F. Teléfono: 56276 9900 Ext. 22500. Correo electrónico: elopezaguilar@hotmail.com

Conclusiones: La sobrevida en aquellos pacientes que sobreexpresan p53 es menor, es necesario que en todo paciente con astrocitoma se realice determinación de expresión de p53 en tejido fresco al menos mediante inmunohistoquímica y en caso positivo, dar un tratamiento más agresivo.

Palabras clave: p53, astrocitoma, cáncer pediátrico, México.

▷ ANTECEDENTES

Los tumores cerebrales representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica. A nivel mundial, la incidencia se encuentra entre 10 y 18 casos por millón por año. La frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es de 12%.¹ Los más frecuentes son los que se derivan de la glía, hasta en 60% y de estos los astrocitomas.^{1,2} La expectativa de vida de acuerdo a la SEER (Surveillance, Epidemiology, End Result) a los cinco años es de 50%.^{3,4-7}

El conocimiento de los factores pronósticos, permite adecuar el tratamiento a éstos pacientes. A pesar de que se conocen algunos factores pronósticos, continúa habiendo un grupo de pacientes con evolución desfavorable, por lo que es importante determinar los factores que llevan a un peor pronóstico, y de esta manera diferenciarlos y tratarlos de una manera más intensiva.

Los factores de mal pronóstico ya conocidos son: edad menor de tres años, ya que a estos pacientes no se les puede ofrecer radioterapia, así como localización e histología. Se han identificado también diversos marcadores biomoleculares que influyen en el pronóstico de estos pacientes. Entre ellos los factores de crecimiento celular que son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular. La sobreexpresión de estos se asocia por lo general a una mayor agresividad biológica y su identificación ha permitido el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.⁵

La proteína p53 es una cadena de 393 aminoácidos, llamada *el guardián del genoma*, promueve los mecanismos de reparación del DNA mediante detección y detención de células con daño de DNA en la fase G1 del ciclo celular. Alternativamente, puede inducir también muerte celular mediante la activación de la apoptosis cuando existen daños genómicos irreparables. El gen que codifica para la

proteína p53 se ubica en el cromosoma 17, actúa como factor de transcripción uniéndose a promotores de genes implicados en la reparación de ADN.⁸⁻¹²

La detección de una sobreexpresión de productos de p53 mediante IHQ se ha asociado con la identificación de mutaciones en el gen TP53 en un gran número de estudios clínicos.¹³⁻²⁶

El objetivo del presente estudio fue determinar si existe asociación entre la sobreexpresión de p53 con la sobrevida de pacientes con astrocitoma y su asociación con la histología de alto o bajo grado.

▷ MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante 2010; se analizaron los expedientes de pacientes diagnosticados con astrocitoma durante el periodo comprendido entre 1995 a 2009. El protocolo fue aprobado por el Comité local de investigación (R-2008-3603-26). Se incluyó a todos los pacientes menores de 17 años con diagnóstico de astrocitoma establecido en el servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que contaban con expedientes completos así como muestra del tumor en bloque de parafina. Todos los pacientes con astrocitomas de alto grado recibieron tratamiento por el servicio de Oncología del Hospital, con el protocolo ICE (carboplatino: 400 mg/m²/día, en día uno, seguido de ifosfamida: 2 g/m² días uno, dos, tres y etopósido: 100/mg/m²/día días uno, dos tres cada cuatro semanas por cuatro cursos), seguido de radioterapia (5400 cGy). Aquellos pacientes con astrocitomas de bajo grado recibieron esquema de quimioterapia con carboplatino 350 mg/m²SC días uno y dos, vincristina 2 mg/m²SC día uno, en cursos repetidos cada cuatro semanas por cuatro cursos seguidos de radioterapia. Se eliminaron

a todos aquellos pacientes que abandonaron el tratamiento o cuyas muestras no pudieron ser procesadas por muestra insuficiente.

Se tomaron de los expedientes los siguientes datos: edad al diagnóstico, sexo, diagnóstico histopatológico, localización de la tumoración, tipo de cirugía así como volumen tumoral residual, fecha de diagnóstico y fecha de defunción o última cita.

Luego de la captura de todos aquellos pacientes con diagnóstico de astrocitoma por patología, se buscaron expedientes y se recolectó información sobre edad al diagnóstico, sexo, localización de tumor, fecha de diagnóstico, quimioterapia utilizada, dosis de RT en aquellos casos en que se utilizó, fecha de recidiva en caso de presentarse y estado actual del paciente, obteniendo con ello el periodo libre de enfermedad y sobrevida global.

Mediante técnica de inmunohistoquímica, se realizó la determinación de expresión de p53 en la célula de tejido tumoral conservado en los bloques de parafina y tejido fresco en congelación, los primeros fueron del servicio de patología de éste hospital, en tanto que los segundos, se encontraban en mantenimiento en el laboratorio de investigación de tumores del SNC.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó con registro de los siguientes datos: número de biopsia o pieza quirúrgica, nombre del anticuerpo a detectar y nombre del médico solicitante. Se buscó un bloque con un control positivo (testigo) al anticuerpo para p53, en nuestro caso se utilizó como testigo cáncer de mama. Se realizaron los cortes histológicos de los bloques de parafina, de un grosor de cuatro micras, montados en laminillas tratadas con poli-L-lisina y en una sola laminilla se colocaron el caso y el testigo. Previa desparafinación de las laminillas a 60°C durante 30 minutos, colocación posterior en xilol y etanol, se realizó la hidratación de los bloques de parafina. Posteriormente se realizó la recuperación de epítopes, mediante el proceso de *desenmascaramiento de epítopes*, con solución de desenmascaramiento de citrato de sodio (Diva Decloaker 10X', Biocare Medical, DV 2004MX, Preparación a 1X'). Se procedió a realizar inmuno-tinción mediante el sistema de biotina-estreptavidina-peroxidasa, en la que se incubó el anticuerpo primario anti-p53 (de ratón antihumano, CLONA DO7), el anticuerpo secundario biotinilado (DAKO BIOTINYLATED LINK UNIVERSAL, REF K0690) y se aplicó el complejo estreptavidina-peroxidasa con cuatro moléculas de peroxidasa para amplificar la señal (DAKO ESTREPTAVIDIN-HRP, REF K0690), posteriormente se reveló con cromógeno 3,3 D-aminobencidina (DAB) (BIOCARE MEDICAL, DABCHROMOGENKIT, REFDB801L).

Realizando una contratincción con hematoxilina de Gill por un lapso de 3 minutos y deshidratación nuevamente de las muestras, se realizó lectura al microscopio de luz.

Se consideró como sobreexpresión cuando más de 50% de los campos estudiados mostraron inmunorreactividad nuclear positiva.

▷ RESULTADOS

Se incluyó un total de 35 pacientes; 18 niñas (51.4%) y 17 niños, con una relación mujer:hombre de 1.05:1. La media de edad al momento del diagnóstico fue de 70.4 meses (16 a 192 meses). Sólo cuatro pacientes fueron menores de tres años de edad. Con respecto a la localización, 13 pacientes (37.1%) tuvieron astrocitoma de localización infratentorial, 12 (34.3%) fueron supratentoriales y 10 (28.6%) localizados en tallo cerebral. De acuerdo con el grado de malignidad, 23 pacientes (65.7%) cursaron con astrocitoma de bajo grado, nueve pacientes (25.7%) tuvieron astrocitoma anaplásico y tres (8.6%) fueron glioblastoma multiforme (**Tabla 1**).

De los pacientes incluidos, 21 (60%) están vivos; con 64% de los hombres vivos *vs.* 55% de las niñas ($p = 0.418$). La mediana de supervivencia de todo el grupo fue de 32 meses (dos a 169 meses). De acuerdo con la edad, 125% de los pacientes menores a 36 meses están vivos, en comparación con el 64.5% de aquellos mayores de tres años de edad ($p = 0.165$).

La mortalidad según la histología fue seis pacientes con astrocitoma de bajo grado (26%). Cinco pacientes con astrocitoma anaplásico (55.5%) y tres pacientes (100%) con glioblastoma multiforme ya murieron ($p = 0.026$).

De los pacientes con localización supratentorial, 50% murieron, comparado con un 38.4% de aquellos con localización infratentorial y 30% de los de localización en tallo cerebral ($p = 0.628$).

Al realizar la inmunohistoquímica encontramos que 23 pacientes (65.7%) fueron negativos para la sobreexpresión de p53; de los cuáles, 16 (69.5%) están actualmente vivos *vs.* 41.6% de aquellos con sobreexpresión de p53 positiva ($p = 0.109$), como se muestra en la **Figura 1**.

Dos de los tres pacientes (66.6%) con glioblastoma multiforme, sobreexpresaron p53, mientras que solo tres de los nueve pacientes (33.3%) con astrocitoma anaplásico y siete (30.4%) pacientes con astrocitoma de bajo grado, fueron positivos para la sobreexpresión de p53 ($p = 0.460$).

Tras un análisis de regresión múltiple, se evidenció que sólo una edad menor a tres años ($p = 0.39$) y la histología de alto grado (astrocitoma anaplásico y glioblastoma

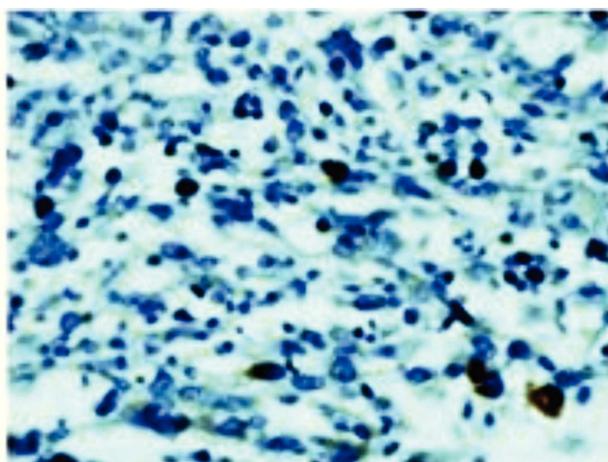
Tabla 1.

Características de los pacientes.

Paciente	Edad al diagnóstico (meses)	Sexo	Localización	Histología	Expresión p53	Estado actual
1	16	M	supratentorial	bajo grado	+	muerto
2	36	M	supratentorial	glioblastoma multiforme	+	muerto
3	56	M	supratentorial	glioblastoma multiforme	+	muerto
4	61	H	infratentorial	anaplásico	+	muerto
5	91	H	tallo cerebral	bajo grado	+	vivo
6	82	H	supratentorial	anaplásico	+	muerto
7	150	M	supratentorial	bajo grado	+	vivo
8	31	H	infratentorial	bajo grado	+	muerto
9	54	M	infratentorial	bajo grado	+	vivo
10	31	H	infratentorial	bajo grado	+	vivo
11	45	M	tallo cerebral	anaplásico	+	muert
12	92	F	tallo cerebral	bajo grado	+	vivo
13	60	H	infratentorial	bajo grado	-	muerto
14	48	H	supratentorial	bajo grado	-	vivo
15	31	M	tallo cerebral	bajo grado	-	vivo
16	40	M	supratentorial	glioblastoma multiforme	-	muerto
17	192	H	tallo cerebral	anaplásico	-	vivo
18	61	H	tallo cerebral	anaplásico	-	vivo
19	87	M	tallo cerebral	bajo grado	-	vivo
20	46	F	tallo cerebral	bajo grado	-	vivo
21	58	H	tallo cerebral	anaplásico	-	muerto
22	39	F	supratentorial	bajo grado	-	muerto
23	85	H	tallo cerebral	anaplásico	-	muerto
24	36	F	infratentorial	bajo grado	-	muerto
25	103	H	supratentorial	bajo grado	-	vivo
26	69	F	infratentorial	bajo grado	-	muerto
27	132	H	supratentorial	bajo grado	-	vivo
28	149	H	infratentorial	bajo grado	-	vivo
29	51	F	infratentorial	bajo grado	-	vivo
30	38	F	supratentorial	bajo grado	-	vivo
31	144	H	supratentorial	bajo grado	-	vivo
32	66	H	infratentorial	bajo grado	-	vivo
33	86	H	infratentorial	bajo grado	-	vivo
34	38	F	infratentorial	anaplásico	-	vivo
35	62	F	infratentorial	anaplásico	-	vivo

Figura 1.

Sobreexpresión p53 en paciente con astrocitoma.



multiforme) ($p = 0.006$) fueron predictores independientes de sobrevida (**Tabla 2**).

La sobrevida de acuerdo al método de Kaplan Meier para los pacientes que no sobreexpresaron p53 fue 69.5% a 120 meses contra 40% a 120 meses para aquellos con sobreexpresión de p53: Log Rank test $p = 0.2189$ (**Figura 2**).

El riesgo (OR) de desarrollar glioblastoma multiforme cuando existe sobreexpresión de p53 es de 4.4 (0.356 – 54.36).

▷ DISCUSIÓN

Aunque se han probado diferentes abordajes terapéuticos alrededor del mundo para mejorar la sobrevida a largo plazo en pacientes pediátricos con gliomas malignos, ésta no excede 60%. Es bien conocido que tumores histológicamente idénticos tienen diferentes comportamientos biológicos y muestran distintos marcadores biológicos lo que sugiere que estos tumores son un grupo heterogéneo de la misma enfermedad.

El conocimiento de los diferentes mecanismos biológicos implicados en el crecimiento y progresión tumoral alienta hacia un mejor sistema de estratificación. La separación en grupos de riesgo de acuerdo a marcadores moleculares permitirá realización de nuevos protocolos terapéuticos, con intensificación de tratamientos quimio y radioterapéuticos para aquellos pacientes ubicados en el grupo de alto riesgo, permitiendo dar tratamientos menos tóxicos a aquellos pacientes de grupos de bajo riesgo. Adicionalmente, el identificar marcadores moleculares puede conducir al desarrollo de drogas dirigidas, lo que –en combinación con la QT y RT– puede ofrecer a los pacientes con astrocitoma y glioblastoma un mejor pronóstico.¹³⁻¹⁸

La importancia de identificar células de iniciación en tumores cerebrales es que ofrece conocimiento acerca de la fisiopatología en pacientes pediátricos con estas neoplasias; provee una nueva visión o idea de los mecanismos de resistencia de los tejidos cancerosos a los tratamientos actuales e identifica nuevos blancos celulares para el tratamiento.

La sobreexpresión de p53 en gliomas pediátricos malignos ha sido previamente reportada por Pollak y

Tabla 2.

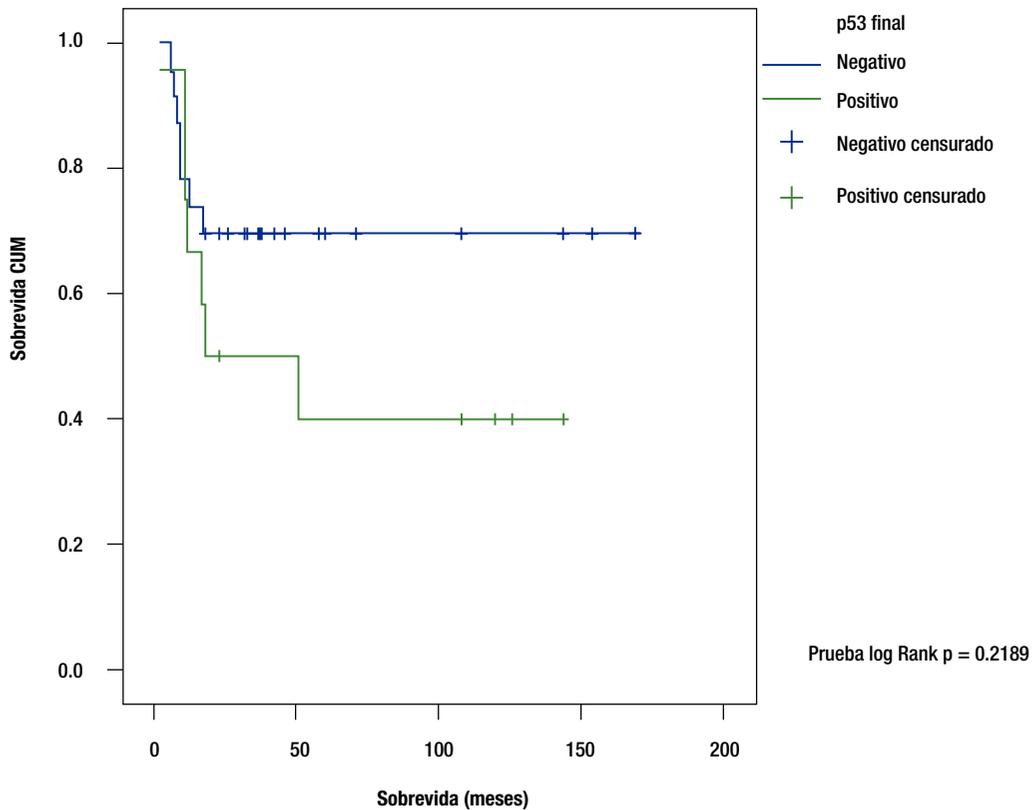
Análisis de regresión múltiple.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes no estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
Sexo (Mujer)	.068	.155	.069	.435	.667
Edad (<36 meses)	-.535	.248	-.348	-2.161	.039
Histología (Astrocitoma anaplásico o Glioblastoma Multiforme)	.495	.168	.479	2.947	.006
Localización (Tallo Cerebral)	-.084	.184	-.078	-.457	.651
p53 (Sobreexpresión)	.112	.159	.114	.700	.490

Dependent Variable: Status (deceased)

Figura 2.

Curvas de supervivencia, con base en sobreexpresión p53.



colaboradores y Ganigi PM y colaboradores. Aunque en nuestra serie, la prevalencia de la sobreexpresión de esta proteína fue ligeramente más baja que la reportada por Ganigi, ésta es similar a la reportada por Pollack (34% vs. 53.7% y 35.6% respectivamente), confirmamos que el hallazgo de ambos autores que los pacientes con sobreexpresión de p53 presentan un peor pronóstico (en nuestra serie, 69% en los niños que no expresan p53, están vivos vs. 40% de los que sobreexpresan p53). Nuestro porcentaje de supervivencia es mayor que el reportado por el *Children's Cancer Group* en 2002 (44% y 17% respectivamente) y puede deberse a los diferentes protocolos quimioterapéuticos y de radiación, con una distribución desigual de astrocitomas de bajo grado y glioblastomas malignos en ambas muestras.¹⁹⁻²⁸

En contraste con Pollack y colaboradores, encontramos que los niños por debajo de cuatro años de edad no sobreexpresaron p53 de manera menos frecuente que los mayores de cuatro años (44% vs 30% respectivamente).

De manera similar, edades menores a tres años, continúan como una variable independiente importante, dado que estos niños no pueden recibir RT durante su tratamiento por el riesgo de importante daño neurológico con la radiación en un cerebro en desarrollo.²⁸

La asociación entre sobreexpresión de p53 y la histología tumoral ha sido también previamente identificada; es mucho más frecuente en glioblastomas que en astrocitomas anaplásicos o gliomas mixtos. En nuestra serie, encontramos un riesgo 4.4 veces mayor de tener glioblastoma multiforme si se sobreexpresa p53, aunque estos resultados deben ser tomados con cautela por el pequeño número de muestra.²⁹⁻³⁶

REFERENCIAS

1. Farinotti M, Ferrarini M, Solari A, Filippini G. Incidence and Survival of Childhood CNS tumours in the Region of Lombardy, Italy. *Brain* 1998;121:1429-1436.
2. Franco-Hernández C, Martínez-González V, Rey J.A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía* 2007;18:373-382

3. Rivera LR, López E, Rivera MH, et al. Survival of children under 3 years old with medulloblastoma: a study from the Mexican Cooperative Group for Childhood Malignancies (AMOHP). *Child's Nerv Syst* 2002;18:38-42
4. US Mortality Files, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention. *Cancer Statistics Review 1975-2006* National Cancer Institute.
5. 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.
6. Prat AR, Galeano SI. Opciones terapéuticas del astrocitoma de bajo grado supratentorial en el adulto. *Arch Neurocienc Mex* 2008;13:35-42.
7. Muñoz CD, Faga CC, Márquez G-SM, Gómez MJ. Nuevas perspectivas en el tratamiento paliativo del glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico recidivado con implantes de carmustina. *Oncología* 2005;28:249-257.
8. Harris CC. p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and cancer risk assessment. *Science* 1993;262:1980-1981.
9. Hernández FC, Martínez GV, Rey JA. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía* 2007;18:373-382.
10. Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, et al. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progresión. *Neuro Oncology* 1999;1:124-137.
11. Barr RD, Holowaty EJ, Birch JM. Classification scheme for tumor diagnosed in adolescents and young adults. *Cancer* 2001;106:1425-1430.
12. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 Function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-526.
13. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. p53 Mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
14. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329:1318-1327.
15. Ständer M, Peraud A, Leroch B, et al. Prognostic impact of TP53 mutation status for adult patients with supratentorial World Health Organization Grade II astrocytoma or oligoastrocytoma. *Cancer* 2004;101:1028-1035.
16. Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, et al. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic pattern. *Int J Cancer* 1994;56:347-353
17. Wallace B, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:64-75
18. Erill N, Colomer A, Verdu M, et al. Genetic and immunophenotype analyses of TP53 in bladder cancer. *Diagn Mol Pathol* 2004;13:217-223.
19. Colomer A, Erill N, Montse, et al. Lack of p53 nuclear immunostaining is not indicative of absence of TP53 gene mutations in colorectal adenocarcinomas. *Applied Immunohistochem Mol Morph* 2003;11:130-137.
20. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-456.
21. Oren M. p53: The ultimate tumor suppressor gene? *FASEB J* 1992;6:3169-3176.
22. Fromental CC, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosom Cancer* 1992;4:1-15.
23. Montenarh M. Biochemical properties of the growth suppressor/oncoprotein p53. *Oncogene* 1992;7:1673-1680.
24. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res* 1991;57: 257-272.
25. Wang J, Ouyang W, Li L, et al. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 nuclear factor KB induced by UV radiation. *Cancer Res* 2005;65:6601-6611.
26. Alarcon D, Vargas R. P53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002;23:541-547.
27. Cohen ME, Duffner P. *Brain tumors in children*. 2th edition. Raven Press. 1998
28. Pollack IF. *Diagnosis and Therapeutic Stratification of Childhood Brain Tumors: Implications for Translational Research*. *J Child Neurol* 2008;23:1179-1185.
29. Rivera LR, López E, Rivera MH, et al. Survival of children under 3 years old with medulloblastoma: a study from the Mexican Cooperative Group for Childhood Malignancies (AMOHP). *Child's Nerv Syst* 2002;18: 38-42.
30. López AE, Sepúlveda VA, Rivera MH, et al. Preirradiation ifosfamide, carboplatin an etoposide (ICE) from the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Sys* 2003;19:818-823.
31. López EA, Sepúlveda VA, Betanzos CY, et al. Phase II study of metronomic chemotherapy with thalidomide, carboplatin-vincristine-fluvestatin in the treatment of brain item tumors in children. *Arch Med Res* 2008;39:655-662.
32. Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial High-Grade Astrocytoma and Diffuse Brainstem Glioma : Two Challenges for the Pediatric Oncologist. *Oncologist* 2004;9:197-206.
33. Watanabe T, Nakamura M, Kros JM, et al. Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol* 2002;103:267-275.
34. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 2004;108:49-56.
35. Nielsen OR, Sorensen M, Carstensen H, et al. Increasing incidence of childhood tumours of the central nervous system in Denmark, 1980-1996. *Br J Cancer* 2006;95:416-422.
36. Lankowsky Philip. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Elsevier 5th Ed. London, UK. 2011.