

# Estandarización de un biobanco de DNA de tumores del sistema nervioso central

Diego Méndez-Rosito,\* Edgar Rangel-López,\*\* María Lucinda Aguirre-Cruz\*\*

## Resumen

**Introducción:** los tumores cerebrales figuran entre las primeras causas de cáncer en el mundo; en el Instituto Nacional de Neurología constituyen la primera causa de morbilidad y mortalidad.

**Objetivo:** estandarizar la toma de biopsia, recolección, procesamiento y almacenamiento de muestras biológicas para estudios moleculares.

**Material y métodos:** previo consentimiento informado, se obtuvieron biopsias de tumores cerebrales y sangre de 134 pacientes. Se extrajo el DNA de los tumores y de las células sanguíneas, se elaboró una base de datos con el registro de los datos generales y clínicos de los pacientes, con base en estándares internacionales para la creación de biobancos (aspectos éticos, técnicos y legales). Se estandarizó el procedimiento de obtención de material biológico en coordinación con el equipo del quirófano y laboratorio, a fin de contar con material biológico óptimo.

**Resultados:** se estandarizó la toma de biopsia, recolección, procesamiento y almacenamiento de las muestras. Se incluyeron 134 pacientes (67 hombres y 67 mujeres) con edad promedio de 46.28 años (rango 15-81). El tumor más frecuente fue el meningioma (42%). La integridad del material obtenido se determinó mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1%.

**Conclusión:** el biobanco del Instituto Nacional de Neurología cuenta con un sistema estandarizado para la obtención de muestras biológicas de óptima calidad para realizar estudios moleculares.

**Palabras clave:** biobanco, tumor cerebral, biopsia.

## Abstract

**Background:** brain tumors are one of the leading cancers worldwide; in the National Institute of Neurology and Neurosurgery (INNN) these tumors are the leading cause of morbimortality.

**Objective:** Standardize biopsies, collection, processing and storage biologic material of molecular studies.

**Methods:** with a previously signed surgical consent, a tumor and blood biopsy was done to 134 patients. Their DNA was extracted and a database was filled considering technical, ethical and legal aspects. In order to have optimal biologic material the procedure was standardized between the surgical and research laboratory teams.

**Results:** The biopsy, transportation, processing and storage were standardized. 134 patients were included (67 male and 67 female) with an average age of 46.28 years (range 15-81). The most frequently biopsied tumor was the meningioma (42%). The integrity of the obtained material was determined by agarose gel electrophoretic analysis.

**Conclusion:** the INNN biobank has a standardized system that biopsies, processes and stores optimum quality biologic material that will be the basis of future molecular studies.

**Key words:** biobank, cerebral tumor, biopsy

## Introducción

Los tumores cerebrales son la neoplasia sólida más frecuente en niños y la séptima causa de morbilidad en adultos.

\* Departamento de Neurocirugía

\*\* Departamento de Investigación, Laboratorio de Neuroinmunología Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

### Correspondencia:

Dr. Diego Méndez Rosito

Insurgentes Sur 3877 colonia La Fama, Delegación Tlalpan, C.P. 14269, México, D.F.

Tel / Fax: (55) 56063822 ext. 2003

Correo electrónico: diegomendezrosito@gmail.com

Recibido para publicación: 2-06-2011

Aceptado para publicación: 3-02-2012

La mortalidad mundial por cáncer muestra un claro patrón ascendente y México no es la excepción a esta tendencia; se registraron cuatro veces más defunciones por neoplasias malignas en el 2000 que en el año 1992. Los tumores cerebrales representan la décima causa de muerte por cáncer en México; las neoplasias cerebrales son las más frecuentes y de mayor malignidad. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía se operan alrededor de 10-15 tumores del sistema nervioso central por semana; los tumores son la primera causa de internamiento.<sup>1</sup>

El diagnóstico de un tumor cerebral se basa, fundamentalmente, en el análisis histopatológico, pero los avances actuales en biología molecular empiezan a identificar marcadores que coadyuvan al diagnóstico certero y al establecimiento del pronóstico de los tumores malignos. En la actualidad no existen estudios de la caracterización de las alteraciones moleculares de los tumores cerebrales en pacientes mexicanos.<sup>2-4</sup>

La estandarización de este biobanco de DNA de tumores del sistema nervioso central forma la primer etapa de una nueva línea de investigación de la biología molecular en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Para realizar estos estudios es necesario contar con muestras óptimas obtenidas con un riguroso sistema estandarizado siguiendo lineamientos de control y calidad internacional. Esperamos que los resultados de estos estudios permitan la caracterización molecular rutinaria para ofrecer mejores diagnósticos, estrategias terapéuticas y, por lo tanto, un favorable pronóstico a nuestros pacientes.<sup>5,6</sup>

## Material y métodos

Se siguieron los estándares internacionales de bioseguridad, ética y aspectos técnicos para la formación de biobancos. Primero se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes a quienes se les explicó, previamente, la naturaleza y objetivo de este estudio. Se tomaron muestras biológicas (biopsias de tumores y sangre) que se procesaron para la obtención de DNA y criopreservación y se utilizaron en estudios de inmunohistoquímica. Simultáneamente se elaboró una base de datos con los aspectos clínicos y de laboratorio de interés de cada paciente que aceptó donar muestras.

### Recolección, transporte y almacenamiento de las muestras

Se realizaron sesiones informativas con el personal de las áreas de Neurocirugía, Enfermería y Laboratorio de Neuroinmunología de este Instituto, con la finalidad de explicarles la logística del proceso de recolección, transporte y procesamiento de las muestras.

En un calendario se registraron los días en que se colectó la muestra. El neurocirujano en turno se comunicó, a primera hora de la mañana, al laboratorio para avisarles la llegada de la muestra. En el laboratorio se prepararon, al momento, 30 mL de paraformaldehído (PFA) al 2% en tubos de 50 mL y se llevaron al quirófano junto con un tanque pequeño con nitrógeno líquido y criotubos suficientes para cada muestra.

Durante la cirugía se tomó una biopsia del tejido tumoral suficiente para colocarla en un tubo con PFA 2% y en un criotubo debidamente rotulados. Los tubos con PFA se colocaron en una gradilla y los criotubos en el tanque con nitrógeno líquido. Simultáneamente se tomó la muestra de sangre con los datos del paciente escritos en un tubo recolector. Las biopsias se recogieron y transportaron de inmediato al laboratorio. Las muestras sanguíneas se almacenaron hasta por 24 horas a 4°C, mientras que las muestras de te-

jido se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido para preservar de manera óptima el material biológico.

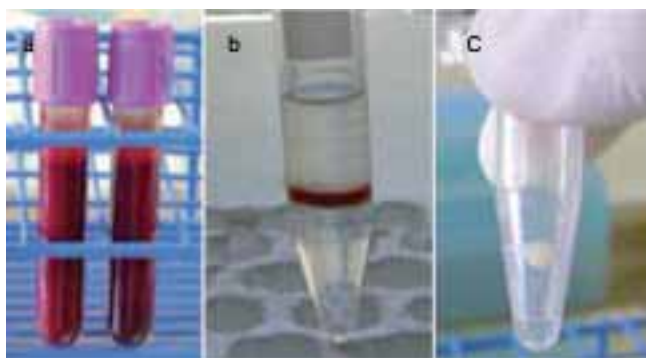
Las muestras de tejido colocadas en los tubos con PFA 2% se dejaron 12 horas en refrigeración para una adecuada fijación y, posteriormente, se cambió la solución del fijador por una solución de sacarosa al 20% por un periodo de 12 horas. Transcurrido ese tiempo se retiró el exceso de líquido de las muestras, se obtuvieron piezas pequeñas y se impregnaron en TissueTek® y se introdujeron 45 segundos en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para congelarlas. Las muestras etiquetadas se almacenaron inmediatamente a -70°C en nitrógeno líquido hasta su uso para ensayos de inmunohistoquímica. (Figura 1)

### Extracción y purificación del DNA de los tumores y de células sanguíneas

El método consistió en la lisis de 8 mL de sangre (Figura 2a) o aproximadamente 250 mg de tejido tumoral conservado en nitrógeno líquido y homogenizado previamente en fragmentos pequeños. Enseguida se agregaron 4 volúmenes del reactivo de lisis, se agitó por inversión 4 minutos y se centrifugó a 2,400 rpm durante 5 minutos. Se adicionaron 2 mL del reactivo B y 500 µL de perclorato de sodio para precipitar proteínas. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se agregaron 2 mL de cloroformo para eliminar lípidos y proteínas. Se agregaron 300 µL de resina para purificar el DNA y se centrifugó 3 minutos a 2,400 rpm. Luego se tomó con mucho cuidado el sobrenadante (Figura 2b) sin contaminantes de la interfase y se colocó en un tubo nuevo de 15 mL para añadir seguidamente 10 mL de etanol absoluto. Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima y la pastilla resultante (Figura 2c) se lavó dos veces con etanol



**Figura 1.** Procedimiento de recolección de tumores del sistema nervioso central. Las muestras se depositan en un frasco con 30 cc de paraformaldehído al 2% y en un criotubo transportado en un tanque con nitrógeno líquido; se procesan para congelarse y almacenarse.



**Figura 2.** Toma y procesamiento para la extracción y purificación del ADN de las células sanguíneas control.

al 70%. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar para finalmente resuspenderla en 250  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Nucleon HT Genomic DNA Extraction Kit, Amersham Biosciences Corp®).

La concentración y pureza del DNA purificado se determinó por  $DO_{260/280}$  nm y la integridad del material obtenido mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1%, que se corrieron 30 minutos a 90 V.

## Resultados

Se obtuvo el consentimiento informado de 134 pacientes que aceptaron participar en el estudio y se integraron sus datos clínicos en una base de datos con la información básica necesaria (número de expediente, iniciales, sexo, edad, diagnóstico transoperatorio e histopatológico confirmado, fecha de cirugía, muestras de tumores y de sangre, concentración de DNA y fecha).

Durante las cirugías de los 134 pacientes el mismo neurocirujano formó parte del equipo quirúrgico con el propósito de garantizar una adecuada toma de biopsia y procesamiento. Según el tipo de tumor fue el tamaño de la muestra. En todas las muestras se obtuvo suficiente tejido para procesarlas con técnica y calidad óptima. Inmediatamente después de tomar la biopsia se transportó la muestra fuera del campo quirúrgico para ser captada por el auxiliar en tres frascos. El primero se destinó para el estudio histopatológico a cargo del Departamento de Patología del INNN; en el segundo tubo, la muestra se fijó con PFA al 2% para estudios de inmunohistoquímica; y el tercero se colocó en un criotubo y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de DNA. De manera simultánea se obtuvieron 8 cc de sangre venosa periférica para obtener el DNA control. Las muestras completas se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento y almacenamiento respectivo.

En las Figuras 3 y 4 se detalla el resultado del análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de las 134 muestras de células sanguíneas y tumorales, respectivamente.

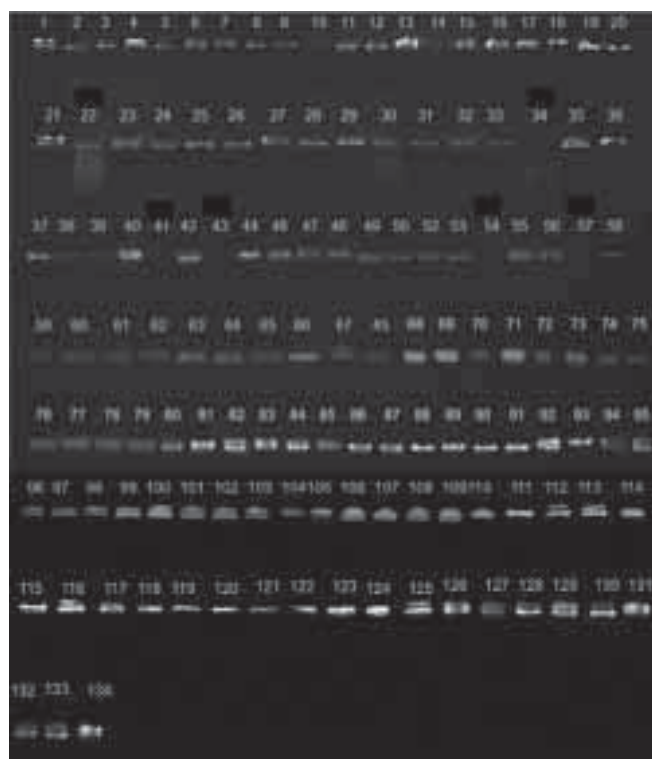
El 50% de las biopsias recolectadas fueron de pacientes de sexo masculino (67 casos) y el resto de pacientes de sexo femenino (67 casos). La edad promedio fue de 46.28 años con un rango de 15-81 años.

Los diagnósticos histopatológicos de los tumores se clasificaron de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud. El tipo de tumor encontrado con más frecuencia fue el originado de células de las meninges, neuroepiteliales y de la hipófisis.

En el Cuadro I se encuentra a detalle la distribución histológica de los tumores almacenados en la base de datos, según la clasificación de la OMS. Entre los tumores originados de las células neuroepiteliales predominaron los derivados de los astrocitos. De los tumores derivados de las meninges los originarios de las células meningoeliales fueron más frecuentes que los derivados de las células mesenquimales. Los tumores más frecuentes de los derivados de las células meningoeliales fueron los meningiomas, mientras los de las células mesenquimales fueron los de histogénesis desconocida (hemangioblastoma). Entre los tumores de células mesenquimales benignos se encontró un lipoma, y en los malignos se registró un condrosarcoma.



**Figura 3.** Análisis de la extracción del DNA de los 134 controles de células sanguíneas corridas electroforéticamente en geles de agarosa al 1%.



**Figura 4.** Análisis de la extracción del DNA de las 134 muestras tumorales corridas electroforéticamente en geles de agarosa al 1%.

## Discusión

La creación de biobancos es un proyecto que ha sido impulsado exitosamente en países desarrollados, por el potencial de datos que pueden obtenerse a partir de las muestras colectadas.<sup>5-7</sup> El Banco Nacional de Especímenes de Investigación Neurológica de la VAMC-UCLA, formado desde 1961, es hoy el biobanco más grande de su género y el de mayor diversidad de muestras reportado en la bibliografía.<sup>3,8</sup> En México, el Instituto Mexicano de Seguridad Social formó hace 20 años un banco de DNA de diversos tejidos para realizar mapeos genéticos y como auxiliar diagnóstico.<sup>9</sup>

La creciente necesidad de nuevas y mejores técnicas clínicas, diagnósticas y terapéuticas ha impulsado la investigación biomédica. Esto ha impulsado mayor conciencia médica y social acerca de la importancia de la formación de bancos de tejidos para su estudio, provocando un importante aumento en el número de bancos de tejidos alrededor del mundo.<sup>10</sup> A su vez, este crecimiento ha visto la necesidad de formar bancos secundarios, caracterizados por administrar los recursos (muestras y bases de datos) de los bancos de una región, como es el caso del UK DNA Banking Network (UDBN).<sup>11-13</sup>

**Cuadro I.** Distribución de las biopsias almacenadas en el biobanco INNN según el origen de los tumores de acuerdo a la clasificación OMS

Neuroepiteliales	32
Astrocitos	25
Oligodendrocitos	0
Ependimocitos	3
Mixtos	1
Plexo Coroides	1
Neuronal	1
Pineales	0
Embrionarios	1
Nervios espinales y craneales	7
Meninges	55
Células Meningoteliales	
Meningiomas	50
Atípicos	0
Anaplásicos	1
Células Mesenquimales	1
Benignos	1
Malignos	0
Melanocitos	2
Histogénesis desconocida	
Hematopoyéticos o linfomas	1
Células germinales	0
Quistes tumorales	4
Selares	23
Regionales con extensión local	0
Metástasis	9

Esta organización permitió establecer los requisitos para satisfacer los Códigos de Conducta Internacionales y, a su vez, señaló los problemas más comunes en la formación de un banco de tumores.<sup>6,14-18</sup> Como resultado hay una clara mejoría en la calidad de las muestras de esta década respecto a la anterior.<sup>19</sup> Todos estos factores, sumados, permiten que la sociedad perciba un sistema organizado, con consideraciones éticas y legales, que les brinda la confianza de que las muestras sean estudiadas de manera adecuada; impulsando un sistema de donadores, investigadores e inversionistas.<sup>20-26</sup>

Los estudios de biología molecular utilizan biomarcadores y tecnología de punta para estudiar la relación entre exposiciones al ambiente, factores genéticos y enfermedades específicas en humanos. Los centros de captación y almacenamiento de material biológico juegan un papel decisivo



en el flujo de información genética de pacientes a los investigadores para su aplicación en la investigación clínica.<sup>21,27</sup> El manejo y almacenamiento cuidadoso de estas pequeñas y valiosas muestras es fundamental. Muchos factores afectan la calidad de la muestra: el tipo de tejido, cuidados durante la obtención de la muestra, tiempo de recolección-almacenamiento, recipientes utilizados, tiempo de tránsito, entre otros. Un diseño experimental eficiente, además de cuidar estos factores, incluye la purificación del DNA y RNA; y la preparación de las muestras para análisis citogenéticos, inmunológicos y bioquímicos.<sup>13,21,28-31</sup>

Los tumores cerebrales son la primera causa de internamiento en el INNN. Por motivos de estandarización de la toma y manejo de las muestras se decidió incluir al proyecto a pacientes con tumores cerebrales en quienes el mismo neurocirujano formaba parte del equipo quirúrgico. Previamente se solicitó el consentimiento informado de familiares y paciente para la toma de biopsia para el banco de DNA de tumores del INNN.

Durante este proceso fue necesaria la comunicación estrecha entre el equipo quirúrgico y el del laboratorio. Este último preparó diariamente los frascos con PFA al 2% para la toma de muestras. A partir de aquí, el equipo quirúrgico eligió la técnica quirúrgica con base en el diagnóstico preoperatorio. Se tomaron tres muestras de tumor: una destinada al laboratorio de histopatología, otra con PFA al 2% y la última en un criotubo que inmediatamente se colocó en un tanque de nitrógeno líquido. De manera simultánea se tomaron 8 cc de sangre venosa periférica que se almacenaron en dos frascos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) que se utilizaron como DNA control. Estas muestras se entregaron al equipo del laboratorio, que se encargó de su rápido procesamiento. La cantidad de muestra del tumor depende del tamaño, consistencia y localización del mismo. Hubo casos en los que se dificultó contar con una cantidad importante de tumor. El tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento es un factor determinante en la calidad de la misma, por lo que para futuras tomas este factor será una variable a considerar.<sup>30</sup>

El procesamiento de las muestras se realizó con el Nucleon Kit Amersham®, siguiendo las indicaciones del fabricante para extraer DNA amplificado de alta calidad de manera consistente. Se corrieron 134 muestras de sangre, en cinco de los tumores no se encontró banda de DNA y en algunos casos se vieron bandas tenues de DNA. Para validar la integridad del DNA se hizo una nueva extracción a partir del tejido y, en algunos casos, se encontró la banda esperada pero en otros no. Esto explica que la biopsia contiene muy pocas células cuyo DNA no fue posible apreciarlo en el gel de agarosa. Con base en esta situación, y como control de calidad, posteriormente se realizará un ensayo

de amplificación de genes constitutivos (ej. GADPH) para amplificarlo por PCR.<sup>32</sup>

En la actualidad se cuenta con las primeras 134 muestras de tumores del sistema nervioso central procesadas y documentadas en una base de datos. La distribución de muestras obtenidas no representa una realidad de la epidemiología de los tumores cerebrales en nuestra población. Estas muestras se obtuvieron al azar, de algunos de los procedimientos quirúrgicos realizados en el INNN.

El material nuclear obtenido de estas muestras fue de pureza y concentración adecuadas para estudiar algunas de las alteraciones genéticas asociadas con los tumores cerebrales específicos en nuestra población. Esto permitiría la confirmación del diagnóstico histopatológico y la identificación de marcadores pronósticos que servirán para la elección temprana de conductas terapéuticas. Puesto que existen cientos de mutaciones encontradas en los tumores, es necesario su estudio genético rutinario. Se requiere contar con recursos para que estos estudios puedan, en el futuro, determinar el tratamiento individualizado a cada paciente.<sup>31,33,34</sup>

## Conclusiones

Ya contamos con un biobanco de DNA de tumores del sistema nervioso central en el INNN. Para esto se tomaron en cuenta los estándares internacionales éticos, técnicos y biológicos para la formación de biobancos. Se estandarizó un sistema para la toma de muestra, su recolección, procesamiento de las muestras para obtener el DNA y su almacenamiento. Con esto garantizamos que el DNA obtenido de cada muestra tiene la calidad óptima para realizar estudios de biología molecular. Con el continuo crecimiento de este biobanco y el desarrollo de nuevos estudios de biología molecular buscaremos mejorar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de nuestros pacientes con tumores del sistema nervioso central.

## Agradecimiento

A las enfermeras de quirófano del INNN MVS por su valiosa colaboración y al Instituto CARSO de la Salud por la beca otorgada durante los años 2009 y 2010.

## Referencias

1. Tirado-Gómez LL, Vela-Rodriguez BE, Mohar-Betancourt A. Epidemiología de los tumores cerebrales. En: Aguirre-Cruz L, Sotelo J, editores. Tumores cerebrales. México: Panamericana, 2008 p. 55-67.
2. Dedova I, Harding A, Sheedy D, Garrick T, Sundqvist N, Hunt C, et al. The Importance of Brain Banks for Molecular Neuropathological

- Research: The New South Wales Tissue Resource Centre Experience. *Int J Mol Sci* 2009;10(19):366-384.
3. Tourtellotte WW, Rosario IP, Conrad A, Syndulko K. Human neurospecimen banking 1961-1992. The National Neurological Research Specimen Bank (a donor program of pre- and post-mortem tissues and cerebrospinal fluid/blood; and a collection of cryopreserved human neurological specimens for neuroscientists). *J Neural Transm Suppl* 1993;39:5-15.
  4. Waldvogel HJ, Bullock JY, Synek BJ, Curtis MA, van Roon-Mom WMC, Faull RLM. The collection and processing of human brain tissue for research. *Cell Tissue Bank* 2008;9(3):169-179.
  5. Vonsattel JP, Amaya MP, Keller CE. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta Neuropathol* 2008;115(5):509-532.
  6. Vonsattel JP, Amaya MP, Cortes EP, Mancevska K, Keller CE. Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York Brain Bank, Taub Institute, Columbia University. *Cell Tissue Bank* 2008;9(3):247-258.
  7. Roa EI, Artigas ACG. A pilot experience with a tumor bank. *Rev Med Chil* 2008;136(6):733-740.
  8. Morente MM, Fernández PL, de Alava E. Biobanking: old activity or young discipline? *Semin Diagn Pathol* 2008; 25(4):317-322.
  9. Salamanca F. Development of specimen banks for research in molecular epidemiology. *Gac Med Mex* 1997;133(Suppl 1):71-74.
  10. McEwen JE, Reilly PR. A Survey of DNA Diagnostic Laboratories Regarding DNA Banking. *Am J Hum Genet* 1995;56:1477-1486.
  11. Yuille M, Dixon K, Platt A, Pullum S, Lewis D, Hall A, et al. The UK DNA banking network: a "fair access" biobank. *Cell Tissue Bank* 2010;11(3):241-251.
  12. Yuille M, van Ommen GJ, Bréchet C, Cambon-Thomsen A, Dagher G, Landegren U, et al. Biobanking for Europe. *Brief Bioinform* 2008;9(1):14-24.
  13. Troyer D. Biorepository standards and protocols for collecting, processing, and storing human tissues. *Methods Mol Biol* 2008;441:193-220.
  14. Viertel C, Zatloukal K. Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI). Implications for pathology. *Pathologie* 2008;29(Suppl 2):210-213.
  15. Bell WC, Sexton KC, Grizzle WE. How to efficiently obtain human tissues to support specific biomedical research projects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(6):1676-1679.
  16. Bell JE, Alafuzoff I, Al-Serraj S, Arzberger T, Bogdanovic N, Budka H, et al. Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol* 2008;115(5):497-507.
  17. Rivas E, Teijeira S, Tardio A, Fachal C, Quintáns B, Navarro C. A brain tissue bank in a neuropathology laboratory. *Basic methodology. Neurologia* 2003;18(10):709-715.
  18. Ravid R. Standard Operating Procedures, ethical and legal regulations in BTB (Brain/Tissue/Bio) banking: what is still missing? *Cell Tissue Bank* 2008;9(2):121-137.
  19. Barnes RO, Parisien M, Murphy LC, Watson PH. Influence of Evolution in Tumor Biobanking on the Interpretation of Translational Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3344-3350.
  20. Watson PH, Wilson-McManus JE, Barnes RO, Giesz SC, Png A, Hegele RG, et al. Evolutionary concepts in biobanking - the BC Bio Library. *J Transl Med* 2009;7:95.
  21. Thornton M, Gladwin A, Payne R, Moore R, Cresswell C, McKechnie D, et al. Automation and validation of DNA-banking systems. *Drug Discov Today* 2005;10(20):1369-1375.
  22. Clark G, Lipworth W, Les B, Little JM, Kerridge IH. An empirical study of tissue banking in Australia: navigating regulatory and ethical challenges. *J Law Med* 2006;14(1):102-109.
  23. Lipworth W. Navigating tissue banking regulation: conceptual frameworks for researchers, administrators, regulators and policy-makers. *J Law Med* 2005;13(2):245-255.
  24. Caulfield T. Tissue banking, patient rights, and confidentiality: tensions in law and policy. *Med Law* 2004;23(1):39-49.
  25. Godard B, Schmidtke J, Cassiman JJ, Aymé S. Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional perspective. *Eur J Hum Genet* 2003;11(Suppl 2):S88-122.
  26. Jendroska K, Patt S, Jänisch W, Cervos-Navarro J, Poewe W. How to run a "brain bank"? Clinical and institutional requirements for "brain banking". *J Neural Transm Suppl* 1993;39:71-75.
  27. Day JG, Stacey GN. Biobanking. *Mol Biotechnol* 2008;40(2):202-213.
  28. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res* 2003;543:217-234.
  29. Tjønneland AM, Olsen A. What are the requirements for establishing a biological specimen bank? *Ugeskr Laeger* 2003;165(16):1686-1688.
  30. McKee AC. Brain Banking: Basic Science Methods. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999;13(Suppl 1):S39-44.
  31. Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DWY, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 2010;24(16):1731-1745.
  32. Seth R, Rameshkumar K, Clark DJ, Rippin J, Scholefield J, Jenkins D. Efficient extraction of DNA from paraffin-embedded tissue using Nucleon HT Kit for clinical molecular pathology research. *Life Science News* 1, 1998 Amersham Biosciences. Disponible en [http://www.gelifsciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FA34936027170C27C1257628001BCA8/\\$file/lisn\\_1\\_14.pdf](http://www.gelifsciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FA34936027170C27C1257628001BCA8/$file/lisn_1_14.pdf)
  33. Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M. Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, DELTA. EGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 2004;21(2):53-56.
  34. Mukasa A, Wykosky J, Ligon KL, Chin L, Cavenee WK, Funari F. Mutant EGFR is required for maintenance of glioma growth in vivo, and its ablation leads to escape from receptor dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(6):2616-2621.