

Lassaletta L*

Del Rio L*

Alfonso C*

María Roda J***

A. Rey J**

Gavilán J*

*Servicio de ORL

**Unidad de Investigación,
Laboratorio de Oncogenética
Molecular

***Servicio de Neurocirugía
Hospital Universitario "La Paz".
Pº de La Castellana, 261. Madrid

Schwannoma vestibular y metilación de RASFF1A: ¿Un crecimiento tumoral?

Vestibular schwannoma and RASSF1A methylation: A marker of tumor growth?

RESUMEN

Introducción y objetivos: La metilación aberrante del promotor es una alteración epigenética capaz de silenciar genes supresores de tumores. Este estudio examina el estado de metilación del DNA de varios genes en una serie de schwannomas vestibulares (SV), analizando su relación con el crecimiento tumoral.

Material y Métodos: Se estudió el estado de metilación de 16 genes incluyendo RASSF1A, RAR-B, VHL, PTEN, HMLH1, RB1, TP16, CASP8, ER, TIMP3, MGMT, DAPK, TP73, GSTP1, TP14, y THBS1 en 22 tumores.

Resultados: El 86% de los tumores mostró metilación uno o más genes. La metilación de RASSF1A se relacionó con el índice de crecimiento clínico.

Conclusiones: La metilación aberrante de ciertos genes tumorales parece implicada en el desarrollo del SV. La metilación aberrante de RASSF1A parece ser un marcador de crecimiento tumoral.

PALABRAS CLAVE:

Metilación del DNA, RASSF1A, Schwannoma vestibular, Crecimiento tumoral, Epigenética.

SUMMARY

Objective: Methylation of promoter regions of DNA is a major epigenetic phenomenon which leads to silencing of tumor suppressor genes. This study investigates the role of DNA methylation in vestibular schwannoma (VS), especially its relationship with tumor growth.

Materials and method: The DNA methylation profile of 16 tumor related genes (RASSF1A, RAR-B, VHL, PTEN, HMLH1, RB1, TP16, CASP8, ER, TIMP3, MGMT, DAPK, TP73, GSTP1, TP14, and THBS1) was examined in 22 VSs using methylation specific PCR and sequencing.

Results: Methylation occurred in at least one gene in 86% of the cases. RASSF1A methylation was associated with the clinical growth index.

Conclusion: Aberrant DNA methylation in VSs contributes to the development of these tumors. RASSF1A methylation may be a marker of growth.

KEY WORDS:

DNA methylation, RASSF1A, Vestibular Schwannoma, Tumor growth Epigenetics.

Introducción

El schwannoma vestibular (SV) es un tumor benigno, habitualmente de crecimiento lento, originado en la porción vestibular del VIII par craneal. La mayoría de los pacientes con un SV consultan por hipoacusia o acúfeno, y muy pocos presentan una clínica más invalidante como parálisis facial, inestabilidad o vértigo. Incluso tumores de gran tamaño son muchas veces asintomáticos. Por ello, la actitud terapéutica ante un paciente con SV es compleja, ya que el tratamiento del tumor tiene como objetivo evitar las complicaciones derivadas de su crecimiento en el ángulo pontocerebeloso, y no necesariamente mejorar la calidad de vida del paciente¹. Las principales opciones ante un SV son observación con RNM seriadas, cirugía y radioterapia.

Si bien no existe consenso sobre el tratamiento más adecuado para estos tumores, sí lo hay en cuanto a la necesidad de encontrar factores que puedan predecir el comportamiento biológico del SV, y en concreto su velocidad de crecimiento². Habitualmente se acepta que la mayor parte de los SVs crecen en torno a 1-2 mm al año, aunque pueden crecer varios cm al año. Se han descrito casos de regresión y casos de estabilización. Sin embargo, parece claro que aumentando el tiempo de seguimiento, la casi totalidad de los tumores crecen³. La pregunta es por tanto a qué velocidad crecerá el tumor de un paciente concreto, y si llegará a poner su vida en peligro para que merezca la pena tratarlo.

Desde el punto de vista genético, la inactivación del gen NF2 localizado en el brazo largo del cromosoma 22 aparece como el principal mecanismo molecular asociado al desarrollo de schwannomas, ya sean de presentación esporádica o asociados a la Neurofibromatosis tipo 2^{4,5}. Las mutaciones inactivantes de este gen se han encontrado hasta en un 60% de los schwannomas esporádicos. También se ha demostrado la existencia de otras regiones del genoma, distintas al cromosoma 22, que aparecen frecuentemente alteradas en schwannomas. Estas regiones (7p, 9q, 10q, 13q, 11q y 17q) podrían ser sede de otros genes involucrados en el desarrollo de estos tumores^{6,7}.

Además de las alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo de diversos tumores tales como los schwannomas, en los últimos años numerosos estudios sugieren que existe un mecanismo alternativo a los mecanismos estrictamente genéticos: se trata de la epigenética. Las alteraciones epigenéticas serían aquellas que producen un cambio en la expresión génica sin afectar a la secuencia de los genes. Uno de los principales mecanismos epigenéticos de inactivación génica es la metilación aberrante de la citosina presente en sitios CpG de las islas CpG de las regiones 5' correspondientes a los promotores génicos. Esta alteración del DNA se ha descrito como mecanismo alternativo de silenciamiento de genes supresores de tumores⁸. Apenas existe información sobre esta alteración en el SV, y su posible implicación clínica o pronóstica. El objetivo de este estudio es examinar el

estado de metilación del DNA de varios genes en una serie de SV intervenidos quirúrgicamente, y analizar su relación con variables clínicas y radiológicas, y especialmente con el crecimiento tumoral.

Material y Métodos

Se estudiaron 22 pacientes intervenidos por SV entre febrero de 2002 y enero de 2004. Las variables analizadas incluyeron edad, sexo, lado, motivo de consulta y duración del mismo. La función facial se evaluó según la escala de House-Brackmann⁹, mientras que para la audición se empleó la discriminación máxima, y los umbrales tonales corregidos, previamente descritos para ajustar el efecto de la presbiacusia en los pacientes con SV¹⁰. El tamaño del tumor se expresó en función de su diámetro máximo en el plano axial de la RNM, así como en función de su volumen tumoral, empleando la fórmula de la elipsoide^{11,12}. Para estimar el crecimiento del tumor se empleó el índice de crecimiento clínico (CGI), que se calcula dividiendo el diámetro máximo del tumor entre la duración de los síntomas del paciente².

El grupo de pacientes estaba formado por 15 mujeres y 7 hombres con edades entre 16 y 71 años (media, 49 años). El tumor era izquierdo en el 64% de los casos. El motivo de consulta fue hipoacusia (45%), acúfeno (23%), inestabilidad (18%), y otros (14%). El porcentaje de pacientes que refirieron cada síntoma fue hipoacusia (82%), acúfeno (68%), inestabilidad (59%), vértigo (9%) y alteraciones de la función facial (13%). La duración media de los síntomas varió entre 1 y 240 meses. La función facial preoperatoria era normal en el 91% de los pacientes y grado II de H-B en el 9% restante. El umbral tonal medio del lado del tumor fue 42 dB, siendo 23 dB en el lado sano. El umbral medio corregido fue 16 dB. La discriminación máxima varió entre 0 y 100% con una media del 70%. El tamaño tumoral medio fue 28 mm (13-55 mm), y el volumen tumoral medio fue 935 mm³ (25-5363 mm³). El CGI osciló entre 1,3 mm/año y 84 mm/año (media 21 mm/año, mediana 12,8 mm/año).

El estudio de metilación aberrante se realizó sobre 22 muestras tumorales de SV y se centró en 16 genes, incluyendo RASSF1A, RAR-B, VHL, PTEN, HMLH1, RB1, TP16, CASP8, ER, TIMP3, MGMT, DAPK, TP73, GSTP1, TP14, y THBS1.

La metodología empleada fue la PCR específica de metilación tras tratamiento del ADN con bisulfito, que permite diferenciar la presencia de alelos metilados y no metilados de los promotores génicos en estudio. La modificación del ADN nómico con bisulfito se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Herman y cols¹³. Para el análisis estadístico se emplearon el Test de Fisher y el Test de Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$ como nivel de significación estadística.

Resultados

Se encontraron valores de metilación de 9-27% en 12 de los 16 genes analizados. Aparecieron tasas de metilación superiores al 10% en 9 genes incluyendo RASSF1A (23%), VHL (27%), PTEN (18%), TP16 (14%), CASP8 (18%), TIMP3 (14%), MGMT (18%), DAPK (18%), y THBS1 (18%). En 3 genes la tasa de metilación fue inferior al 10%, HMLH1, TP73, y GSTP1 (9% cada uno), mientras que en 4 genes RARB, RB1, ER, y TP14 no se encontró metilación alguna.

La metilación de CASP8 se relacionó con la edad y con el tamaño tumoral. La frecuencia de metilación para CASP8 fue mayor en los tumores más pequeños y en los pacientes mayores. La edad media de los pacientes que presentaron metilación del promotor de CASP8 fue 61 años, mientras que la edad media de los pacientes sin metilación del gen fue 46 años ($p=0,03$). El tamaño medio de los tumores con

el gen CASP8 metilado y no metilado fue 30 mm y 20 mm, respectivamente ($p=0,04$). La metilación del gen TP73 se asoció con la pérdida de audición. Los umbrales de audición corregidos fueron 43 dB y 17 dB para los pacientes con el gen TP73 metilado y no metilado respectivamente ($p=0,04$), siendo 1000 Hz la frecuencia más afectada. La metilación de RASSF1A se relacionó con la duración de los síntomas, con 74 meses y 20 meses para los casos metilados y no metilados respectivamente ($p=0,039$). Del mismo modo, la metilación de este gen se relacionó con el CGI. El CGI medio de los pacientes con el gen RASSF1A metilado fue 9 mm/año, mientras que el CGI medio de los pacientes con el gen no metilado fue 25 mm/año ($p=0,03$). No se encontraron relaciones significativas entre la metilación de los genes y otros parámetros clínicos o radiológicos relevantes.

Discusión

En los últimos años se ha producido un enorme desarrollo en el estudio de la epigenética. Mientras que la genética se refiere a la información que transmite una secuencia de genes, las alteraciones epigenéticas serían aquellas que producen cambios en la expresión génica sin afectar a la secuencia de los genes. La principal modificación epigenética en humanos es la metilación de la citosina localizada en el dinucleótido CpG. Cuando existen los correspondientes factores de transcripción y la isla CpG permanece en estado no metilado, se produce la transcripción de un determinado gen¹⁴. Por el contrario, la metilación de las regiones CpG del promotor se asocia con una estructura de cromatina compacta, que ocasiona un silencio transcripcional del gen implicado. La hipermetilación de las regiones reguladoras representa por tanto un mecanismo alternativo a la delección y la mutación para el silenciamiento de los genes supresores de tumores¹⁵.

Mientras que la metilación del DNA en el cáncer ha sido objeto de numerosas publicaciones¹⁶, apenas existen estudios sobre metilación en SVs. Horiguchi y cols¹⁷ estudiaron la metilación del promotor de RASSF1A en una serie de tumores cerebrales benignos y malignos. Encontraron metilación del gen en el 10% de los SVs, sugiriendo que la metilación de RASSF1A no es frecuente en los tumores cerebrales benignos. Kino y cols¹⁸ estudiaron la región promotor del gen NF2 humano para identificar qué mecanismos moleculares regulan la expresión del gen NF2 a mRNA y ver si la expresión del gen NF2 podría estar regulada por una mutación o bien por un cambio epigenético. Encontraron metilación de islas CpG en 14 de 23 SVs, concluyendo que la expresión del gen NF2 está regulada por metilación sitio-específica del promotor NF2 y que esta metilación aberrante de los elementos del promotor podría llevar a la formación de tumores relacionados con NF2 sin necesidad de alteración de la secuencia de DNA. González-Gómez y cols¹⁹ estudiaron la metilación de 12 genes en una serie de 44 SVs esporádicos o asociados a NF2. Encontraron que los genes THBS1, TP73, MGMT, NF2 y TIMP3 fueron los más frecuentemente metilados, sugiriendo que la metilación aberrante de NF2 es un paso inicial en el desarrollo del SV, mientras que la metilación de otros genes tumorales sería un evento secundario a la inactivación del gen NF2.

En este estudio hemos encontrado valores de metilación variables en 12 de 16 genes analizados, incluyendo RASSF1A, VHL, PTEN, TP16, CASP8, TIMP3, MGMT, DAPK, THBS1, HMLH1, TP73, y GSTP1. La metilación de RASSF1A se asoció al crecimiento tumoral evaluado mediante el CGI. La familia de protooncogenes RAS desempeña un papel fundamental en las vías de transducción de señales involucradas en la proliferación y supervivencia celular. RASSF1 es un gen supresor de tumores con tres productos de transcrip-

ción principales (A, B y C). Se ha observado que RASSF1A, localizado en 3p21.3, presenta metilación aberrante en un porcentaje significativo de carcinomas de mama, ovario y próstata²⁰. La metilación de RASSF1A es responsable de la inactivación de dicho gen supresor de tumores. Por ello debería ser un factor de mal pronóstico en tumores malignos. Sin embargo, los hallazgos descritos hasta la fecha son inciertos^{21,22}. Igualmente, la metilación de RASSF1A en tumores benignos muestra resultados poco concluyentes^{23,24}. En nuestro estudio, encontramos metilación de RASSF1A en el 23% de los SVs, existiendo una asociación entre dicho hallazgo y el crecimiento tumoral. El estado de metilación del gen se correlacionó inversamente con el CGI. Este resultado aparentemente contradictorio podría explicarse por la naturaleza benigna del SV y su crecimiento irregular, diferente del comportamiento agresivo de las neoplasias malignas, con un patrón de crecimiento más predecible.

La predicción del crecimiento del SV es imposible con los medios actuales. La mayoría de los estudios utilizan el CGI para evaluar el crecimiento tumoral. Al depender de la estimación que el paciente hace sobre la duración de sus síntomas, se ha cuestionado la validez de este método²⁵. Si bien el seguimiento de los pacientes con RNM seriadas parece un método más exacto, también presenta limitaciones importantes, pues las series en las que se emplea suelen excluir los tumores de mayor tamaño con presentación clínica más agresiva, que lógicamente requieren tratamiento precoz y no permiten realizar un control radiológico. Y es en estos casos en los que más importancia tendría identificar a tiempo factores predictivos de crecimiento. En nuestro estudio, la metilación de RASSF1A se relacionó con el crecimiento tumoral. Si bien son necesarios más estudios con un mayor número de pacientes, la confirmación de su valor predictivo de crecimiento podría condicionar la actitud ante un determinado paciente durante la cirugía, orientando hacia la conveniencia o no de una resección total o subtotal, con las lógicas implicaciones sobre la función facial o auditiva.

Bibliografía

- Lassaletta L, Alfonso C, Del Río L, Roda JM, Gavilan J. Impact of Facial Dysfunction on Quality of Life After Vestibular Schwannoma Surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006;115:694-698.
- Herwadker A, Vokurka EA, Evans DG, Ramsden RT, Jackson A. Size and growth rate of sporadic vestibular schwannoma: predictive value of information available at presentation. *Otol Neurotol* 2005;26:86-92.
- Charabi S, Thomsen J, Tos M, Charabi B, Mantoni M, Borgesen SE. Acoustic neuroma/vestibular schwannoma growth: past, present and future. *Acta Otolaryngol* 1998;118:327-32.
- Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Moreno S. Cytogenetic analysis in human neurinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;28:187-8.
- Jacoby LB, MacCollin M, Louis DN, Mohney T, Rubio MP, et al. Exon scanning for mutation of the NF2 gene in schwannomas. *Hum Mol Genet* 1994;3:413-9.
- Bello MJ, de Campos JM, Kusak ME, Vaquero J, Sarasa JL et al. Clonal chromosome aberrations in neurinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;6:206-11.
- Warren C, James LA, Ramsden RT, Wallace A, Baser ME, et al. Identification of recurrent regions of chromosome loss and gain in vestibular schwannoma using comparative genomic hybridisation. *J Med Genet* 2003;40:802-6.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-29.
- House JW, Brackmann DE. Facial nerve grading system. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1985;93:146-147.
- Graamans K, Van Dijk JE, Janssen LW. Hearing deterioration in patients with a non-growing vestibular schwannoma. *Acta Otolaryngol* 2003;123:51-4.
- Caye-Thomasen P, Werther K, Nalla A, Bog-Hansen TC, Nielsen HJ, et al. VEGF and VEGF receptor-1 concentration in vestibular schwannoma homogenates correlates to tumor growth rate. *Otol Neurotol* 2005;26:98-101.
- Del Río L, Lassaletta L, Alfonso C, Sarriá MJ, Gavilan J. Disociación clínica- tamaño tumoral en el neurinoma del acústico. *Acta Otorrinolaringol* 2006 (en prensa)
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation specific PCR: a novel assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-6.
- Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;196:1-7.
- Bello MJ, González-Gómez P, Rey JA. Metástasis en el sistema nervioso central: biología molecular. *Neurocirugía* 2004;15:590-595
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8681-6.
- Horiguchi K, Tomizawa Y, Tosaka M, Ishiuchi S, Kurihara H, et al. Epigenetic inactivation of RASSF1A candidate tumor suppressor gene at 3p21.3 in brain tumors. *Oncogene* 2003;22:7862-5.
- Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, et al. Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 2001;6:441-54.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D. CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:5601-6.
- Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:576-83.
- Choi N, Son DS, Song I, Lee HS, Lim YS, et al. RASSF1A is not appropriate as an early detection marker or a prognostic marker for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2005;115:575-81.
- Yamaguchi S, Kato H, Miyazaki T, Sohda M, Kimura H, et al. RASSF1A gene promoter methylation in esophageal cancer specimens. *Dis Esophagus* 2005;18:253-6.
- Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, et al. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene* 2001;20:7573-7.
- Banelli B, Gelvi I, Di Vinci A, Scaruffi P, Casciano I, et al. Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors. *Oncogene* 2005;24:5619-28.
- Mohyuddin A, Vokurka EA, Evans DG, Ramsden RT, Jackson A. Is clinical growth index a reliable predictor of tumour growth in vestibular schwannomas? *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2003;28:85-90.

Correspondencia

Dr. Luis Lassaletta Atienza
Servicio de ORL - Hospital Universitario "La Paz"
Paseo de La Castellana, 261 - 28046 MADRID
luikilassa@yahoo.com