

LA INESTABILIDAD MICROSATÉLITE Y LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR MLH1 SE ASOCIAN CON LA APARICIÓN TARDÍA DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO

El silenciamiento del gen reparador de mutaciones MLH1 por hipermetilación de su promotor es la principal causa de inestabilidad microsatélite (MSI) en tumores esporádicos tanto de origen colorectal (CC) como endometrial (CE). Los CC con MSI y MLH1 metilado ocurren en pacientes con más edad que los CC sin estas alteraciones moleculares. Sin embargo, en CE esta relación es controvertida.

En este trabajo hemos estudiado la relación entre la edad y el estado MSI y de metilación de MLH1, en una serie amplia de pacientes con CE. El MSI se estableció usando tres marcadores de inestabilidad (BAT-26, BAT-25 y AP Δ 3). Para determinar la hipermetilación del promotor MLH1 se usó el MS-SSCA (*methylation-sensitive single-strand conformation analysis*). El 20% de las muestras de CE eran MSI, y el 80% de estas tenían MLH1 metilado. La edad en el diagnóstico de las pacientes con tumores MSI fue significativamente más elevada que la de las pacientes con tumores que presentaban estabilidad de microsatélites (MSS). (edad \pm SD: 67.1 \pm 9.6 años vs 63.4 \pm 10.0 años, $p=0,034$, test de Fisher). Los tumores MSI con MLH1 metilado ocurrieron en pacientes de más edad que los que presentan MLH1 no metilado o MSS. (68.5 \pm 9.5 años vs 61.4 \pm 8.0 años vs 63.4 \pm 10.0 años, respectivamente, $p=0,008$, test de Chi-cuadrado).

Estos resultados sugieren la existencia de diferencias epidemiológicas en pacientes con CE con diferentes estados de inestabilidad de microsatélites y de metilación del promotor MLH1.

Silencing of the MLH1 mismatch repair enzyme by promoter hypermethylation is the main cause of microsatellite instability (MSI) in sporadic tumors of both colorectal (CC) and endometrial (EC) origins. While CC with MSI and methylated MHL1 occur in patients older than those without these molecular alterations. The data on EC, however, are conflictive.

Here we studied the relationships among these clinical and molecular variables in a large series of patients with EC. Microsatellite status was established by using three mononucleotide repeats (BAT-25, BAT-26 y AP Δ 3). MLH1 promoter hypermethylation status was studied by methylation-sensitive single-strand conformation analysis (MS-SSCA). Twenty-percent of tumors had MSI, and eighty-percent of them had methylated MLH1. Age at diagnosis of patients with MSI tumors was significantly higher than those with microsatellite stable (MSS) tumors (mean \pm SD: 67.1 \pm 9.6 years vs 63.4 \pm 10.0 yrs, $p=0.034$, Fisher's exact test). MSI tumors with methylated MLH1 happened in patients older than patients with either MSI tumors with unmethylated MLH1 or MSS tumors (68.5 \pm 9.5 vs 61.4 \pm 8.0 vs 63.4 \pm 10.0, respectively, $p=0.008$, Chi-squared test).

Our results suggest the existence of epidemiological differences among these three EC groups.

R. Ramírez-Moreno

F. G. Rodríguez

C. Bilbao

O. Falcón

L. León

B. N. Díaz-Chico

J. C. Díaz-Chico

La inestabilidad microsatélite (MSI) se caracteriza por la acumulación de miles de mutaciones en regiones repetitivas o microsatélites del ADN

La implicación de las alteraciones epigenéticas podría ser clave en el CE, ya que explicaría la baja frecuencia de mutaciones en los genes reparadores que caracteriza a los tumores con MSI

INTRODUCCIÓN

El cáncer de endometrio (CE) es el tumor ginecológico de localización pélvica más frecuente en Europa y Estados Unidos (Evans, 1995). Aunque se detecta en estadios iniciales, entre un 10-15% de las pacientes tratadas recaen a los 5 años y más tarde mueren a causa del cáncer. Aparece en mujeres con una media de edad de 63 años y la mayoría de los casos no son hereditarios sino esporádicos (Whelan, 2002).

La base molecular del cáncer es la serie acumulada de alteraciones genéticas que conducen a un crecimiento celular descontrolado. La inestabilidad microsatélite (MSI) se caracteriza por la acumulación de miles de mutaciones en regiones repetitivas o microsatélites del ADN. Esto se debe a defectos en los genes que las reparan, entre los que se incluyen el MLH1 o el MSH2 (Ionov, 1993; Perucho, 1996).

Algunas de estas alteraciones genéticas afectan a genes del cáncer (oncogenes y genes supresores) que presentan en su secuencia codificante regiones microsatélites. Se ha observado MSI en diferentes tipos de tumores como los de los tractos gastrointestinal y urogenital, tanto esporádicos como hereditarios. En el CE esporádico, el MSI se presenta en el 15-20% de los casos, sin embargo en esos tumores MLH1 o MSH2 tienen una baja frecuencia de mutación (Risinger, 1993; Duggan, 1994; Katabuchi, 1995; Lim, 1996; Kobayashi, 1996).

Desde hace unos años ha tomado cuerpo la idea de que el cáncer no es sólo una enfermedad genética, sino que también incluye un componente

epigenético. La implicación de las alteraciones epigenéticas podría ser clave en el CE, ya que explicaría la baja frecuencia de mutaciones en los genes reparadores que caracteriza a los tumores con MSI.

La epigenética hace referencia a cambios en la función de un gen heredables mitóticamente y/o meióticamente y que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del ADN. Entre los procesos epigenéticos implicados en la carcinogénesis, el mejor conocido es el de la metilación aberrante de la citosina (C) en los dinucleótidos 5'CpG 3' (G = guanina).

Algunos estudios han demostrado que la hipermetilación de CpG, del promotor de MLH1 se asocia con una baja expresión de este gen, tanto en líneas celulares como en tumores primarios. En tumores colorectales (CC), gástricos (CG) y en CE de origen esporádico, el estado MSI se atribuye a la hipermetilación del promotor de MLH1 (Kane, 1997; Herman, 1998; Esteller, 1998; Fleisher, 1999; Leung, 1999; Simpkins, 1999).

Los CC con MSI y MLH1 metilado ocurren en pacientes con más edad que los CC sin estas alteraciones moleculares (Mal-khosyan, 2000). En CG, la frecuencia de metilación de MLH1 parece también aumentar con la edad (Nakajima, 2001). Sin embargo, en CE los datos existentes son contradictorios.

OBJETIVO

Estudiar la relación entre la edad en el momento del diagnóstico y el estado MSI y la hipermetilación del promotor del gen MLH1 en una serie amplia de CE.

MATERIAL Y MÉTODOS

La serie incluyó a 204 pacientes consecutivos con CE, diagnosticadas y tratadas en el departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario Materno Infantil de Gran Canaria (Islas Canarias, España) entre 1990 y 1999. La mediana de edad de las pacientes diagnosticadas fue de 63 años (rango: 29-90 años). El ADN tumoral fue aislado por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. Para la determinación de MSI se usaron tres marcadores de inestabilidad: BAT26, BAT25 y APΔ3 que son repeticiones mononucleotídicas de 26(A), 25(A) y 18(A) respectivamente. El tamaño de los productos de PCR se analizó usando electroforesis capilar en Abi PRISM 3100 y el GeneScan software (Applied Biosystem Corp.) (Ver figura 1).

MS-SSCA (*Methylation-sensitive single-strand conformation analysis*) (Clark, 1994; Paulin, 1998; Bianco, 1999; Dobrovic, 2002), que consiste en:

1) modificación del ADN por tratamiento químico con bisulfito sódico (las C no metiladas se transforman en timinas y las metiladas no se modifican)

2) PCR del ADN modificado, para esto diseñamos nuestros propios primers (*Forward*: 5' GAT TGG ATA GTT TGA ATG TTA 3' y *Reverse*: 5' ACA TCT CTA CTC CTA TTA ACT 3') y pusimos a punto las condiciones óptimas de la PCR:

1 μL de ADN modificado con bisulfito, 25 pmol de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 1x Gold Buffer, 200 μM de dNTPs y 1.75 U de AmpliTaq Gold polimerase (Roche Molecular Systems, Inc.) en un volumen final de 25

En tumores colorectales (CC), gástricos (CG) y endometriales (CE) de origen esporádico, el estado MSI se atribuye a la hipermetilación del promotor de MLH1

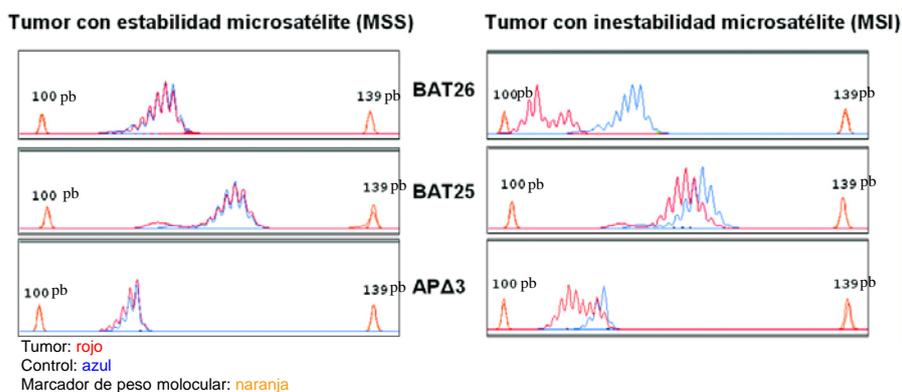


Figura 1. Electroforesis capilar para la determinación del estado MSI. Se consideran MSI cuando existe variación de dos o más bases en al menos dos marcadores de repeticiones mononucleotídicas.

Estudiamos el estado de metilación de una región específica del promotor del gen MLH1, que metilada se correlaciona con la pérdida de expresión del gen. Ésta comprende los nucleótidos -80 al -279 tomando como referencia el nucleótido donde se inicia la transcripción. Para este análisis se usó la

μL. [95°C 15 min, seguido de 35 ciclos de 95°C 30 seg, 56°C 30 seg y 72°C 30 seg, finalmente 72°C 10 min].

3) SSCA (*single-strand conformation analysis*) en gel vertical de poliacrilamida al 10% con un aparato Hoefer SE 600 (Amersham Biosciences) corri-

do a 80 voltios 18h con TBE 0,5X. Este gel se tiñe con SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) y se visualiza en un transiluminador de luz ultravioleta. (Ver Figura 2)

(edad±SD: 67.1±9.6 años vs 63.4±10.0 años, respectivamente, p=0,034, test de Fisher). Los tumores MSI con MLH1 metilado ocurrieron en pacientes de más edad que los

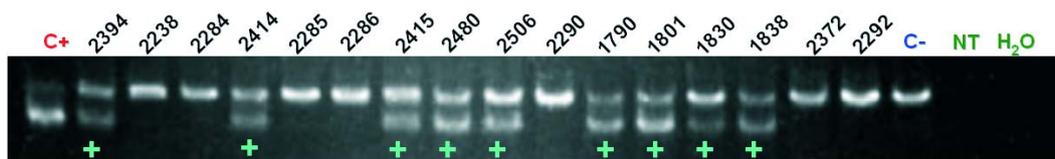


Figura 2. SSCA del estudio de la hipermetilación del promotor del gen MLH1. (C+) control positivo, (C-) control negativo, (NT) ADN no tratado con bisulfito sódico y (H₂O) agua. (+) Muestra metilada

Los tumores MSI con MLH1 metilado ocurrieron en pacientes de más edad que los que presentaron MLH1 no metilado o MSS

Para confirmar nuestros resultados, purificamos las bandas de los productos de PCR y los secuenciamos usando el Big Dye terminator sequencing kit, Ver. 3.1 (Applied Biosystems Corp.) (Ver Figura 3). En el análisis estadístico se emplearon los test no paramétricos de la Chi-cuadrado y de Fisher.

RESULTADOS

El 20% de las muestras de CE presentaron MSI, y el 80% de estas tenían el MLH1 metilado. La edad en el diagnóstico de las pacientes con tumores MSI fue significativamente mayor que la de los tumores MSS.

que presentaron MLH1 no metilado o MSS. (68.5±9.5 años vs 61.4±8.0 años vs 63.4±10.0 años respectivamente, p=0,008, test de Chi-cuadrado) (Ver Tabla 1).

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

La incidencia de MSI en nuestra serie (20%) está en el rango de lo publicado en CE esporádico (9-43%) (Risinger, 1993; Duggan, 1994; Caduff, 1996). De igual manera, la frecuencia de hipermetilación del promotor MLH1 asociada con MSI observada (80,5%) está dentro de los valores descritos previamente (69-92%) (Esteller, 1998; Simpkins, 1999; Salve-

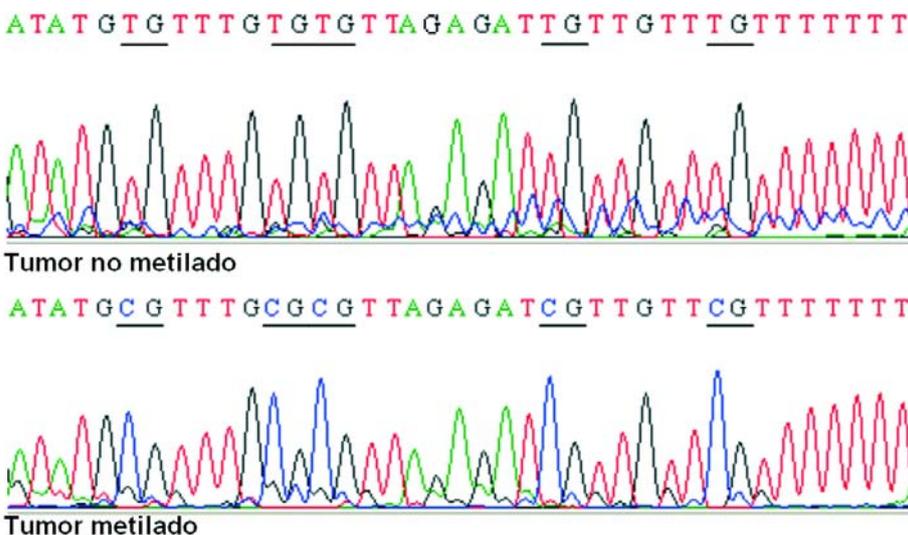


Figura 3. Secuencias de una región del promotor MLH1 rica en CpG. Las CpG no metiladas cambian a TpG, en cambio las metiladas no se modifican.

MS	N(%)	Edad de diagnóstico (años ± SD)
MSS	163 (80 %)	63.4 ± 10.0
MSI	41 (20 %)	67.1 ± 9.6
MSI-MLH1 no-met	8 (19,5 %)	61.4 ± 8.0
MSI-MLH1 met	33 (80,5 %)	68.5 ± 9.5
MSI vs MSS		P=0,034
MSI - MLH1 met vs MSI - MLH1 no-met vs MSS		P=0,008

Tabla 1. Relación del estado de inestabilidad microsatélite (MS) y de metilación del promotor de MLH1 con la edad de diagnóstico de las pacientes

sen, 2000). Nuestros datos indican que en el CE esporádico existe una asociación entre la edad en el diagnóstico de las pacientes y la presencia o ausencia de MSI y del estado de metilación del promotor MLH1 en los tumores. La edad de las pacientes con tumores MSI y MLH1 metilado es 7 años más elevada que la de las pacientes con tumores MSI y MLH1 no metilado o MSS. Algo similar ha sido descrito en CC y CG, si bien en el CC la diferencia de edad se eleva a 18 años (Mal-khosyan, 2000; Nakajima, 2001). Futuras investigaciones ayudarán a desvelar los procesos moleculares que subyacen en las asociaciones observadas.

BIOGRAFÍA

El grupo de estudio del cáncer de endometrio del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC) está constituido por:

1.- El grupo de Oncología Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

R. Ramírez-Moreno, F. G. Rodríguez, C. Bilbao, B. N. Díaz-Chico, J. C. Díaz-Chico.

2.- Miembros de los Servicios de Obstetricia y Ginecología y Patología del Hospital Universitario Materno-Infantil de Las Palmas de Gran Canaria.

O. Falcón, L. León.

Últimos trabajos publicados:

- Rodríguez FG, Bilbao C, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Falcón O Jr, Díaz BP, Rivero JF, Perucho M, Díaz-Chico BN and Díaz-Chico JC. "Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer". *Int J Cancer*, (2006) 118: 1420-1425.

- Bilbao C, Rodríguez G, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Rivero JF, Falcón O Jr, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC, Perucho M. "The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer". *Int J Cancer*, Published Online: 27 Feb (2006).

BIBLIOGRAFÍA

Bianco T, Hussey D, Dobrovic A. *Methylation-sensitive, single-strand conformation analysis (MS-SSCA): A rapid method to screen for and analyze methylation*. *Hum Mutat*, (1999) 14: 289-93.

Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. *Clinical and pathological significance of*

En el CE esporádico existe una asociación entre la edad en el diagnóstico de las pacientes y la presencia o ausencia de MSI y del estado de metilación del promotor MLH1 en los tumores

Futuras investigaciones ayudarán a desvelar los procesos moleculares que subyacen en las asociaciones observadas

microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. Am J Pathol, (1996) 148: 1671-8.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. *High sensitivity mapping of methylated cytosines.* Nucleic Acids Res, (1994) 11: 2990-7.

Dobrovic A, Bianco T, Tan LW, Sanders T, Hussey D. *Screening for and analysis of methylation differences using methylation-sensitive single-strand conformation analysis.* Methods, (2002) 27: 134-8.

Duggan B, Felix J, Muderspach L, Torgeman D, Zheng J, Shibata D. *Microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma.* J Natl Cancer Inst, (1994) 86: 1216-1221.

Esteller M, Levine R, Baylin SB, Hedrick Ellenson L, Herman JG. *MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas.* Oncogene, (1998) 17: 2413-2417.

Evans DGR. *Genetics of gynaecological cancer.* Curr Obstet Gynaecol, (1995) 5: 201-205.

Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. *Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability.* Cancer Res, (1999) 59: 1090-1095.

Herman JG, Uma A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF,

Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma.* Proc Natl Acad Sci USA, (1998) 95: 6870-6875.

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis.* Nature, (1993) 363: 558-561.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of the expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.* Cancer Res, (1997) 57: 808-811.

Katabuchi H, Van Rees B, Lambers AR, Ronnett BM, Blazes MS, Leach FS, Cho KR, Hedrick L. *Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas.* Cancer Res, (1995) 55: 5556-5560.

Kobayashi K, Matsushima M, Koi S, Saito H, Sagae S, Kudo R, Nakamura Y. *Mutational analysis of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2, in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability.* Jpn J Cancer Res, (1996) 87: 141-145.

Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. *hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability.* Cancer Res, (1999) 59: 159-164.

