

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS MUTACIONAL Y EPIGENÉTICO EN MENINGIOMAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jesús Lomas Huertas

Bajo la dirección de la doctora

María Josefa Bello

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2473-6

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS MUTACIONAL Y EPIGENÉTICO
EN MENINGIOMAS**

JESÚS LOMAS HUERTAS

Vº Bº del Director de la Tesis

Vº Bº del Tutor

Doctorando

Fdo. Mª Josefa Bello

Fdo. Araceli Gallego

Fdo. Jesús Lomas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS MUTACIONAL Y EPIGENÉTICO

EN MENINGIOMAS

JESÚS LOMAS HUERTAS

Dedicado a los verdaderos culpables
de que yo haya llegado aquí.

Agradecimientos:

A la Directora de esta tesis, Dra. Bello, por la confianza depositada en mi desde el principio y por su gran implicación en este trabajo. Gracias también al Dr. Rey, sus acertados consejos, así como su “mano dura” han contribuido a que este trabajo llegara a buen puerto.

A la Tutora de mi tesis, Dra. Gallego: “gracias, Araceli, por tu cercanía”.

Este trabajo se realizó gracias a la beca concedida por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario “La Paz”. Quiero agradecer al Dpto. de Cirugía Experimental y a todo su personal la colaboración desinteresada que siempre me han prestado.

A los chicos de Inmunología por su amistad.

A Blanca, Conchita, Chus y Pepa de la facultad de Veterinaria, por poner la semilla.

A mis compañeras de laboratorio (Cinthia, Eva, Isabel, Lola y Pilar): “¡Gracias chicas! Sin vuestra ayuda, aliento y amistad nunca lo habiéramos logrado”.

A todos mis amigos, de aquí y de allí por creer en mí.

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional.

Y a ti, que aunque llegaste la última...

Cuando todo estaba gris y el aliento me faltó,
cuando todo parecía perdido y la confianza me falló,
allí estuviste, y tu presencia “me devolvió la vida”.

*“Arrancar a la Naturaleza
los secretos que han dejado desconcertados
a los filósofos de todas las épocas,
seguir las pistas de sus raíces
las causas de la enfermedad...
éstas son nuestras ambiciones.”*

Sir William Osler

1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	31
3.2. MÉTODOS	34
3.2.1. Obtención y dosaje de ADN genómico	34
3.2.2. Ensayos realizados con el ADN	35
3.2.2.1. Análisis mutacional	35
3.2.2.1.1. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	35
3.2.2.1.2. Polimorfismo en la conformación de la cadena sencilla (SSCP)	40
3.2.2.1.3. Secuenciación automática del ADN	41
3.2.2.2. Análisis epigenético	42
3.2.3. Análisis estadístico	45
4. RESULTADOS	47
4.1. ANÁLISIS MUTACIONAL	48
4.1.1. Genes localizados en 22q	48
4.1.1.1. Análisis del gen <i>NF2</i>	48
4.1.1.2. Análisis del gen <i>INI1</i> ^{<i>hSNF5</i>}	56
4.1.2. Genes localizados en 1p	61
4.1.2.1. Análisis del gen <i>TP73</i>	61
4.1.2.2. Análisis del gen <i>p18</i> ^{<i>INK4c</i>}	65
4.2. ANÁLISIS EPIGENÉTICO	67
4.2.1. Promotor del gen <i>NF2</i>	67

4.2.2. Patrón de metilación	72
5. DISCUSIÓN	78
5.1. ANÁLISIS MUTACIONAL	79
5.1.1. Genes localizados en 22q	79
5.1.1.1. Análisis del gen <i>NF2</i>	79
5.1.1.2. Análisis del gen <i>INI1^{hSNF5}</i>	88
5.1.2. Genes localizados en 1p	93
5.1.2.1. Análisis del gen <i>TP73</i>	93
5.1.2.2. Análisis del gen <i>p18^{INK4c}</i>	96
5.2. ANÁLISIS EPIGENÉTICO	97
5.2.1. Promotor del gen <i>NF2</i>	97
5.2.2. Patrón de metilación	99
6. CONCLUSIONES	112
7. BIBLIOGRAFÍA	115

1.- INTRODUCCIÓN

El fenómeno tumoral es un proceso complejo cuyo inicio tiene lugar cuando una célula pierde la capacidad de controlar su crecimiento y división. Las células así transformadas serían capaces de multiplicarse indefinidamente e incluso proliferar en otros tejidos u órganos ajenos a su origen, propiedades ambas que pueden llegar a ser letales para el organismo en que se producen (Izquierdo, 1995).

Dos son, por tanto, las principales características que definen a las células tumorales (Cairns, 1977):

- a) Inmortalidad: Crecimiento indefinido de ese clon celular.
- b) Transformación: Conjunto de fenómenos celulares que incluyen una división celular más frecuente y en condiciones ambientales más adversas, la pérdida de la necesidad de una superficie sólida a la que adherirse o su capacidad de agruparse con otras para formar agregados de células sin control.

Las causas de los fenómenos neoplásicos son amplias y diversas e incluyen genéticas *stricto sensu*, epigenéticas y ambientales. Frecuentemente son necesarios cambios múltiples y de distinta naturaleza para producir un tumor, pero todos ellos actúan sobre un sustrato genético presente ya en la célula “fundadora” de esa neoplasia. Para la comprensión de los mecanismos moleculares que originan el proceso neoplásico la Citogenética ha jugado un papel importante. Sus resultados han permitido centrar las investigaciones posteriores en sucesos clave, como la reestructuración y delección de genes o regiones concretas del genoma y han contribuido a determinar el papel que juegan éstas en la etiología, iniciación, progreso y metástasis de los tumores (Benito,

1994). Los estudios moleculares realizados han permitido en muchos casos identificar genes responsables de estos acontecimientos.

Se sabe que el desarrollo tumoral es un proceso dinámico que ocurre por una serie de alteraciones que confieren a estas células una ventaja selectiva para el crecimiento *in vivo*. Ello implica la desregulación de los procesos de control de la proliferación celular, asociándose ésto a la génesis de formas tumorales cada vez más agresivas con capacidad de invasión y metástasis (Izquierdo, 1995). Estas alteraciones, que producen bien una activación descontrolada del desarrollo o bien la pérdida de las funciones reguladoras del crecimiento celular, afectan a dos tipos primordiales de genes: proto-oncogenes y genes supresores de tumor (GST). Otro tipo de genes involucrados en procesos neoplásicos son los genes que codifican para proteínas reparadoras de ADN (Muñoz, 1997).

Sus principales características diferenciadoras son:

a) Los proto-oncogenes codifican para proteínas que favorecen la proliferación celular y la diferenciación. Su activación por mutación, o el aumento de su expresión es la que produce la alteración (carácter dominante a nivel celular). Ejemplos de estos son: *ABL* (homólogo del oncogén presente en el virus de la leucemia de Abelson), *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico), *MYCN*, *HRAS* (homólogo del oncogén presente en el virus del sarcoma de Harvey), ... entre otros.

b) Las alteraciones en los genes oncosupresores actúan de forma recesiva a nivel celular, ya que son reguladores negativos del crecimiento celular. Como la función es inhibitoria, ambas copias de un gen supresor han de inactivarse para

contribuir al desarrollo tumoral, hipótesis de los dos sucesos (Knudson Jr., 1971 y Knudson, 1993). La inactivación puede deberse a: dos mutaciones, delección + mutación, metilación + delección u otras combinaciones de sucesos. Algunos ejemplos de GST son: *TP53*, *RBI* (gen de susceptibilidad al retinoblastoma), *BRCA1* (gen de susceptibilidad al cáncer de mama), *p16^{INK4a}*, ... entre otros.

c) Los genes reparadores de ADN, *hMSH2*, *hMLH1*, *MGMT* (O⁶-Metilguanina-ADN metiltransferasa) y otros, codifican para enzimas responsables de subsanar las alteraciones, en la secuencia de ADN, producidas por errores durante la replicación o las inducidas por radiaciones y agentes químicos.

En el conjunto de neoplasias humanas, los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) representan aproximadamente el 9% del total (Balaña y cols., 2001).

Las condiciones especiales en las que se desarrollan estos tumores, de origen neuroectodérmico (Balaña y cols., 2001), son:

- Localización en centros vitales para el organismo.
- Histogénesis compleja de los tipos celulares que componen el conjunto del tejido nervioso.
- Capacidad de invasión local (diseminación por el neuroeje y a nivel intracerebral).
- La recidiva es una característica relativamente común en estos tumores.
- Las metástasis se presentan con una frecuencia muy baja.

En el SNC coexisten principalmente cinco tipos celulares que pueden dar lugar a otros tantos tipos de tumor, además de la posibilidad de aparición de tumores mixtos. Los tipos tumorales más frecuentes son: gliomas (origen astrocítico, origen oligodendrocítico u origen ependimario), meningiomas, schwannomas, neuroblastomas, meduloblastomas, perineurales (PNT) y en menor proporción tumores de hipófisis y glándula pineal (Balaña y cols., 2001).

Los meningiomas son neoplasias que tienen su origen en células del revestimiento leptomeningeo del cerebro y la médula espinal, en concreto, a partir de células aracnoides de las meninges (Russel y Rubinstein, 1989). Son el segundo tipo más común de tumores del SNC tras los de origen astrocítico. Suponen entre un 13 y un 18% del total de tumores intracraneales primarios (Kepes, 1982) y alrededor del 25% de los intraespinales (Russel y Rubinstein, 1989). La incidencia anual de esta neoplasia es aproximadamente de 6 de cada 100.000 individuos, en los estudios epidemiológicos más extensos llevados a cabo en USA (Lantos y cols., 1996), teniendo un pico de incidencia entre la sexta y séptima década de vida y afectando de forma preferente a las mujeres en una proporción de 3 a 1 (Zang, 1982).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los meningiomas en 9 subtipos histológicos (Kleihues y cols., 2000), siendo los más frecuentes:

- Meningiomas Fibromatosos: Presentan una tipología celular alargada y estrecha además de una abundante cantidad de reticulina.
- Meningiomas Meningoteliales: Es la variedad histológica más común, caracterizándose por crecer en forma de nódulos amplios y redondeados y por la poca presencia de reticulina.

- Meningiomas Transicionales: El tumor exhibe características de ambos patrones.

Siguiendo los criterios de la OMS existen a su vez tres grados de malignidad en los meningiomas de acuerdo a su grado de desdiferenciación (Kleihues y cols., 2000):

- Grado I (benigno): Es el tipo de meningioma más frecuente, representando cerca del 90% de los meningiomas. Se caracterizan por un aumento del crecimiento de un grupo de células en el lugar donde normalmente se halla y un escaso índice mitótico.
- Grado II (atípico): Se presenta con una frecuencia entre el 4,7 y el 7,2% de los meningiomas y se caracteriza por un gran aumento de la actividad mitótica, la necrosis y el pleomorfismo nuclear.
- Grado III (anaplásico): Los tumores presentan signos evidentes de malignidad, como la infiltración del tejido circundante además de los anteriores. Su frecuencia se encuentra entre el 1 y el 2,8%.

La caracterización citogenética de los meningiomas indica que la pérdida parcial o total del cromosoma 22 es la alteración más característica, como se demostró ya en la década de los 70 (Mark y cols., 1972; Zankl y Zang, 1972). Estudios posteriores llevados a cabo por diversos grupos en aproximadamente 350 meningiomas confirmaron que cerca del 70% de los tumores analizados presentaban alteraciones del cromosoma 22 (Zang, 1982; Al Saadi y cols., 1987; Maltby y cols., 1988; Rey y cols., 1988; Poulsgard y cols., 1989 y 1990; López-Gines y cols., 1989 y 1993; Casalone y cols., 1990; Griffin y cols., 1994). Los datos aportados por estos estudios permitieron diferenciar varios subgrupos de meningiomas desde el punto de vista citogenético:

- Meningiomas con cariotipos normales, representan entre el 15 y el 20%.
- Meningiomas con alteraciones que afectan al cromosoma 22. Son el 70% de los casos. Dentro de éstos encontramos dos subtipos:
 - a. Aquellos en los que sólo se presentan alteraciones en el cromosoma 22. Son entre el 50 y el 60% de los meningiomas.
 - b. Tumores con alteraciones en el cromosoma 22 y en otros cromosomas. Se clasifican aquí entre el 10 y el 20% restante.
- Meningiomas con anomalías numéricas y/o estructurales, que no afectan al cromosoma 22: son entre el 5 y el 10%.

A raíz de estos hallazgos, fue en el cromosoma 22 donde se intentó localizar, en primer lugar, una región crítica relacionada con la génesis de este tipo tumoral.

Como ya hemos indicado previamente, entre un 10 y un 20% de meningiomas presentan alteraciones numéricas y/o estructurales en otros cromosomas, añadidos a la monosomía en el 22, encontrándose principalmente a nivel de 1p, 10 y 14q lo que se asoció a progresión a formas más agresivas de meningiomas (Rey y cols., 1988; Henn y cols., 1995; Schneider y cols., 1995; Kolles y cols., 1995; Perry y cols., 1996; Weber y cols., 1997; Kahn y cols., 1998; Ishino y cols., 1998; Müller y cols., 1999). También se identificaron, aunque en una proporción baja, anomalías en los cromosomas 7, 8, 11, 18, 19 y 20 (Casalone y cols., 1987; Rey y cols., 1988; Casartelli y cols., 1989; Vagner-Capodano y cols., 1993; Lekanne-Deprez y cols., 1995a; López-Gines y cols., 1995).

La acumulación de todas estas alteraciones, secundarias a la pérdida del cromosoma 22, jugaría un papel en la adquisición de agresividad por parte de algunos

meningiomas.

Los datos citogenéticos unidos a los que aportó la genética molecular con el estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH), por análisis de fragmentos polimórficos de restricción (RFLP) de loci del cromosoma 22, más concretamente en su brazo largo, han mostrado dos zonas de 22q asociadas a patogénesis de meningiomas: la región 22q12.3-qter y la región 22q11-q12 (Dumasky y cols., 1987; Meese y cols., 1987; Seizinger y cols., 1987; Dumanski y cols., 1990; Cogen y cols., 1991; Lekanne Deprez y cols., 1991; Sansón y cols., 1992; Rey y cols., 1992 y 1993). Estos hallazgos sugerirían la existencia en 22q de al menos un GST involucrado en la patogénesis de meningiomas.

Los estudios moleculares han corroborado también la idea de asociación entre la acumulación de pérdidas de heterocigosidad en otros cromosomas (1p, 10q y 14q) y las formas atípicas y anaplásicas de meningiomas (Rempel y cols., 1993; Bello y cols., 1994 y 1995; Lindblom y cols., 1994; Simon y cols., 1995; Menon y cols., 1997; Tse y cols., 1997; Sulman y cols., 1998; Lamszus y cols., 1999; Leone y cols., 1999; Bello y cols., 2000; Joachim y cols., 2001; Cai y cols., 2001; Murakami y cols., 2003; Mihaila y cols., 2003a y 2003b). En relación con el cromosoma 1 estos trabajos señalaban concretamente dos zonas que presentaban una frecuencia de LOH mayor en formas agresivas y malignas (1p36 y 1p32) por lo que se postuló la existencia en ellas de algún gen o genes relacionados con progresión tumoral en meningiomas. En 14q se han localizado dos regiones (14q22-24 y 14q32) que parecen estar asociadas a progresión tumoral (Menon y cols., 1997, Bandera y cols., 1997; Cai y cols., 2001). En el cromosoma 10, se ha encontrado una región altamente delecionada en meningiomas en 10q23 que se asociaría a malignidad en este tipo tumoral (Rempel y cols., 1993; Li y

cols., 1997; Steck y cols., 1997).

Este mecanismo de progresión tumoral a través de un proceso de múltiples etapas (Rempel y cols., 1993; Simon y cols., 1995; Weber y cols., 1997; Leone y cols., 1999) es similar al descrito por primera vez por Fearon y Vogelstein (1990) para cáncer colorectal.

Una vez acotadas las regiones del cromosoma 22 asociadas a la génesis de meningiomas así como aquellas en otros cromosomas relacionadas con la progresión, sobretodo las ubicadas en 1p, el siguiente paso fue la búsqueda en todas ellas de genes candidatos a supresores de tumor.

Un dato que ayudó a identificar el gen responsable de la génesis de meningiomas, es la presentación de este tipo de tumor, no sólo de forma esporádica y como meningiomas múltiples (Louis y cols., 2000a y 2000b; Lomas y cols., 2002) sino también asociado al síndrome de predisposición familiar al cáncer Neurofibromatosis tipo 2 (NF2). Esta enfermedad se conoce también como Neurofibromatosis central o acústico-bilateral. Esta última denominación alude a la presencia de schwannoma vestibular bilateral en los nervios auditivos lo que constituye un criterio diagnóstico para esta entidad. Los pacientes con NF2 pueden presentar también con bastante frecuencia otros tipos de tumor como los mencionados meningiomas, o ependimomas y astrocitomas (Evans y cols., 2000; Baser y cols., 1998 y 2003). Otros rasgos no tumorales asociados a este síndrome son las cataratas o los hamartomas de retina. La Neurofibromatosis tipo 2 se hereda de forma autosómica dominante, tiene una incidencia aproximada al nacimiento de 1 de cada 40.000 individuos y una penetrancia estimada del 95% (Evans y cols., 1992).

Se ha demostrado de manera fehaciente, tras su aislamiento y caracterización por

clonaje posicional, que la inactivación del gen *NF2* localizado en la región 22q12.2 es la causante del desarrollo de este síndrome (Rouleau y cols., 1993; Trofatter y cols., 1993). La región codificante de dicho gen está compuesta por 17 exones. La transcripción del gen *NF2* produce dos ARN mensajeros mayoritarios, que codifican dos isoformas de la proteína. La isoforma I es una proteína de 595 aminoácidos que carece de los residuos aminoacídicos del exón 16. La isoforma II conserva los codones del exón 16, perdiendo el exón 17, lo que produce una proteína más pequeña de 590 aminoácidos (Bianchi y cols., 1994).

La proteína codificada por este gen, llamada Merlin o Schwannomina muestra cierta homología de secuencia con la superfamilia de proteínas homólogas a la banda 4.1 (DAL-1, ezrina, radixina, moesina, ...) algunas de las cuales ligan el citoesqueleto con la membrana celular (Trofatter y cols., 1993). Más concretamente, merlin y algunas proteínas de esta superfamilia conocidas como proteínas ERM, tienen un papel clave en la regulación de la organización del citoesqueleto, la adhesión celular y la movilidad.

La secuencia proteica, en todos los miembros de la superfamilia ERM, está compuesta por un dominio N-terminal que enlaza con proteínas de membrana y que abarca en merlin los aminoácidos situados entre la posición 1 y la 311; un dominio rico en α -hélice desde el aminoácido 312 hasta el 505 de merlin y un dominio C-terminal desde el 506 hasta el final de esta proteína y con el que se asociarían a proteínas del citoesqueleto (Gonzalez-Agosti y cols., 1996; Scoles y cols., 1998; Xu y cols., 1998; Obremski y cols., 1998; Goutebroze y cols., 2000).

Por todo ésto el gen *NF2* es un candidato muy sólido a GST, como se comprobó al confirmar la existencia de mutaciones germinales en pacientes de NF2 y la necesidad de que haya dos alteraciones en este gen para que su expresión se modifique (Rouleau y

cols., 1993; Trofatter y cols., 1993; MacCollin y cols., 1994; Bourn y cols., 1994; Merel y cols., 1995a y 1995b).

El gen *NF2* se encuentra mutado en un porcentaje de meningiomas esporádicos que varía según las series, encontrándose valores de alrededor del 20% (Harada y cols., 1996; Ueki y cols., 1999), próximos al 30% (Lekanne Deprez y cols., 1994; Ng y cols., 1995; De Vitis y cols., 1996b; Joachim y cols., 2001) y de hasta el 60% (Troffatter y cols., 1993; Wellenreuther y cols., 1995).

En diversas series de meningiomas y schwannomas de pacientes con NF2, los porcentajes de mutación oscilan entre el 50% encontrado por Jacoby y cols. (1997), el 56% obtenido por Bijlsma y cols. (1994) en 5 de 9 muestras, hasta el 80% detectado por Koga y cols. (1998), Hung y cols. (2000) y Mohyuddin y cols. (2002).

En schwannomas esporádicos se encuentran series con un porcentaje de mutación del 44% (Bijlsma y cols., 1994). En ependimomas el porcentaje encontrado es del 10 y el 14%, en las dos series descritas (Ebert y cols., 1999; Alonso y cols., 2002). No se encuentran mutaciones en astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas y oligoastrocitomas (Rubio y cols., 1994; Ng y cols., 1995; Hoang-Xuan y cols., 1995; Mérel y cols., 1995b; De Vitis y cols., 1996a; Alonso y cols., 2002). Tampoco se detectaron mutaciones de *NF2* en otros tipos tumorales del SNC menos frecuentes, meduloblastomas, neuroblastomas y hemangiopericitomas (Mérel y cols., 1995b; Joseph y cols., 1995).

Se encontraron mutaciones (4 de 8) en tumores perineurales, de la vaina que envuelve a los nervios periféricos, (PNT) en la única serie descrita (Lasota y cols., 2001).

En tumores no neurogénicos, se ha encontrado una proporción del 41% (7/17) en

mesoteliomas (Sekido y cols., 1995), un 30% (6/20) en melanomas, 3% en carcinomas de Colon (Bianchi y cols., 1994) y un 2% en carcinomas de mama (Arakawa y cols., 1994). En series de cáncer de ovario y de pulmón no se encontraron alteraciones de secuencia (Englefield y cols., 1994, Sekido y cols., 1995).

Algunos investigadores han establecido una asociación entre el tipo histológico de meningioma y el patrón genético tumoral. Estos autores hallaron que el 80% de los casos con mutaciones en el gen *NF2* presentan histología fibromatosa o transicional mientras que no más de un 25% de tumores meningoteliales presentan mutaciones en este gen (Ruttledge y cols., 1994, Wellenreuther y cols., 1995; Louis y cols., 1995; Evans y cols., 2001). Estos resultados fueron corroborados por estudios de expresión, midiendo niveles de ARN mensajero y proteína (Lee y cols., 1997; Wellenreuther y cols., 1997). Todo ello sugiere una génesis histológica y un patrón genético distinto para el subtipo meningotelial (Kros y cols., 2001; Dezamis y Sanson, 2003).

Abundantes estudios han intentado correlacionar las mutaciones encontradas en el gen *NF2* y el grado de afectación del síndrome NF2, siendo el mapa mutacional del gen *NF2* recopilado por MacCollin, (1996) el más extenso en este campo (www.dem0nmac.mgh.harvard.edu/neurowebforum/NeurofibromatosisMenu.html).

Según esta revisión, corroborada por trabajos posteriores (Kluwe y cols., 1996; Ruttledge y cols., 1996; de Vitis y cols., 1996; Koga y cols., 1998; Stokowski y Cox, 2000; Brault y cols., 2001), un 65% de las mutaciones encontradas en el gen *NF2* son mutaciones sin sentido o de cambio de patrón de lectura que causan, ambos tipos, una proteína truncada, y se les asocia a un grado de afectación severo. Las mutaciones de cambio de sentido se presentan en dicha revisión con una frecuencia del 10% y suelen estar asociadas a una afectación leve, como sucede con las mutaciones que de este tipo

se han localizado en la mitad C-terminal de la proteína (Scoles y cols., 1998) que causan una reducción en la afinidad de merlin por la β II-espectrina. Por último, las mutaciones intrónicas en las zonas de corte y unión, cuya frecuencia se estima alrededor del 25%, tienen asociado un grado de afectación variable, que puede ser severo o leve dependiendo de otros factores (Kluwe y cols., 1998; de Klein y cols., 1998; Kauffman y cols., 2002).

Existen otros mecanismos para anular la actividad normal de merlín. Uno es el aumento de la actividad proteolítica, debido a estrés oxidativo (Kaneko y cols., 2001), de la μ -calpaina, una proteasa dependiente de calcio que degrada merlin. Un incremento en la degradación de merlin por este desajuste se ha relacionado con el desarrollo de algunos meningiomas y schwannomas en los que no se había encontrado mutaciones del gen *NF2* (Kimura y cols., 1998). Estos autores identificaron la zona de lisis en los límites entre los dominios N-terminal y α -hélice (residuos 288-339).

También se encuentra relacionado con la regulación de merlin el estado de fosforilación de sus restos Serina y Treonina, el control del estado de fosforilación se lleva a cabo a través de la vía Rac de transducción de señales. La fosforilación del aminoácido Ser 516 ha sido asociada con la pérdida de adhesión celular y por tanto con la actividad tumorigénica debida a la alteración de la función normal de merlin (Takeshima y cols., 1994; Shaw y cols., 1998 y 2001).

Todo lo anterior llevó a concluir que el funcionamiento normal de merlin sería el resultado de un equilibrio entre varias isoformas y estados conformacionales de la proteína. De esta manera en las células tumorales el equilibrio se desplazaría hacia variantes de la proteína, con una conformación alterada, lo que provocarían el desarrollo neoplásico (Goutebroze y cols., 2000).

Recientemente se ha desarrollado una herramienta novedosa para el estudio de la formación y la progresión de los meningiomas (Kalamarides y cols., 2002). Se trata de la utilización de ratones (*Mus musculus*) “knockout” homocigotos condicionales en los que el gen *NF2* se inactiva gracias a la actuación de adenovirus recombinante con recombinasa Cre (Wang y cols., 1996). Este modelo animal para el estudio del desarrollo tumoral en meningiomas tiene la ventaja de que la alteración genética puede ser introducida en una muy pequeña población celular, lo que es con mucha probabilidad un modelo de cáncer más ajustado a la realidad que aquel en el que todas las células del tejido diana son mutadas.

Existen en el cromosoma 22 otras regiones, a parte de 22q12.2, en las que se han encontrado una asociación entre pérdida de heterocigosidad y meningiomas. En ellas también se intentaron localizar genes potencialmente relacionados con el desarrollo de esta neoplasia. Se ha propuesto a un nuevo miembro de la familia de las β -adaptinas (*BAM22*), localizado en 22q12 y que se encuentra alterado por delección en homocigosis en un 13% de los meningiomas sin alteración en el gen *NF2* (Peyrard y cols., 1994). En este trabajo no se encuentran mutaciones puntuales, lo que ha llevado a sus autores a proponer que la inactivación de este posible oncosupresor se llevaría a cabo por medio de modificaciones en la región reguladora de dicho gen.

El gen *MNI*, localizado en 22q11, está interrumpido por una traslocación t(4,22) en un meningioma y ha sido relacionado con la patogénesis de este tipo tumoral (Lekanne Deprez y cols., 1995b).

En la búsqueda de otros genes candidatos a oncosupresor en el cromosoma 22, los análisis citogenéticos y moleculares han mostrado que deleciones en la región 11.2 del brazo largo del cromosoma 22 (22q11.2) se presentan como una característica de los

Tumores Rhabdoides Malignos (MRT), una forma de cáncer pediátrico muy agresivo (Douglass y cols, 1990; Shashi y cols., 1994; Fort y cols., 1994; Biegel y cols., 1996). En esta región se ha localizado el gen *INI1^{hSNF5}*, más concretamente en 22q11.23. Este gen fue aislado por clonaje posicional (Kalpana y cols., 1994) y consta de nueve exones que codifican para un miembro del complejo multiproteico SWI/SNF. Esta proteína interviene en procesos de remodelación de la cromatina dependientes de ATP, facilitando, a través de ésta, la activación transcripcional de genes inducibles, pues se facilita el acceso al ADN de factores de transcripción (Kalpana y cols., 1994; Murchardt y cols., 1995; Wang y cols., 1996; Kwon y cols., 1994; Côté y cols., 1994). Recientemente, y de forma complementaria, se ha demostrado que este gen es un potente regulador de la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular, lo cual refuerza su papel como oncosupresor (Versteeg y cols., 1998 y 2002). Se han encontrado mutaciones en líneas celulares y en diversos tipos tumorales, mayoritariamente en cánceres pediátricos agresivos aunque también en otros tipos tumorales como leucemias, linfomas, gliomas y meduloblastomas (Versteeg y cols., 1998; DeCristofaro y cols., 1999; Sévenet y cols., 1999a y 1999b; Biegel y cols., 1999; Grand y cols., 1999; Yuge y cols., 2000; Biegel y cols., 2000), por el contrario en ependimomas solo se han encontrado polimorfismos (Kraus y cols., 2001). Recientemente se han descrito mutaciones de cambio de sentido en el exón nueve de *INI1^{hSNF5}* y algunos polimorfismos en una serie de 126 meningiomas, tomando así cuerpo la idea de su potencial importancia en la génesis de este tipo de tumores (Schmitz y cols., 2001).

La probada asociación entre pérdida de heterocigosidad en 1p, 10q y 14q con las formas agresivas y malignas de meningiomas han centrado en esas zonas los esfuerzos para encontrar genes relacionados con la progresión tumoral de este tipo de neoplasia.

Se ha demostrado que la región 1p32 se encuentra frecuentemente deletada en meningiomas agresivos (Bello y cols., 1994). Uno de los genes localizados aquí fue *hRAD54* (homólogo al gen reparador de ADN de *S. cerevisiae RAD54*), que consta de 18 exones y que codifica para una proteína cuya función es reparar roturas de la doble cadena de ADN. Las mutaciones en este gen fueron poco frecuentes en meningiomas (Mendiola y cols., 1999). Otro gen localizado en esta región fue *p18^{INK4c}*, que codifica para una proteína (p18) perteneciente a la familia de los inhibidores del complejo ciclina-quinasa dependiente de ciclina. La expresión de *p18^{INK4c}* produce *in vivo* inhibición de la proliferación y el desarrollo celular (Guan y cols., 1994). Este gen sería candidato a oncosupresor por su función, y en él se han encontrado mutaciones en oligodendrogliomas, aunque en una baja proporción (Husemann y cols., 1999 y He y cols., 2000). Un trabajo posterior, indicaba que las mutaciones en este gen son muy raras, presentándose solo en un meningioma agresivo (Boström y cols., 2001). También existen trabajos que no encontraron mutaciones en meningiomas (Santarius y cols., 2000 y Leraud y cols., 2000) por lo que la responsabilidad de este gen en el fenómeno tumoral es un dato a confirmar.

Estudios de LOH han señalado también que la región 1p36 podría estar relacionada con la progresión tumoral en meningiomas (Bello y cols., 1994; Versteeg y cols., 1995; Bello y cols., 2000). En esa zona, Kaghad y cols. (1997), identificaron el gen *TP73* (1p36.33), el cual aparece como el candidato más firme a oncosupresor de los localizados en esa región. Este gen codifica para una proteína (p73) con alta homología de secuencia con la proteína p53, especialmente en los dominios de activación transcripcional, de unión a ADN y de oligomerización (Kaghad y cols., 1997; Liu y cols., 2000). Las diferencias estructurales entre p53 y p73 se encuentran en el fragmento

C-terminal de este último, comprobándose la presencia de hasta seis isoformas distintas con diferentes estructuras C-terminales (De Laurenzi y cols., 1998 y 1999; Ueda y cols., 1999). Se ha encontrado una baja tasa de mutaciones de *TP73* en la amplia variedad de neoplasias estudiadas: del total de 1459 tumores analizados, se han encontrado 6 mutaciones, según una reciente revisión del tema (Melino y cols., 2002). Concretamente, en tumores del sistema nervioso central sólo se han descrito dos mutaciones (Alonso y cols., 2001; Lomas y cols., 2001), una de ellas en un meningioma, incluido en el presente estudio.

Algunos resultados indican que el gen *TP73* tiene función oncosupresora (Kaghad y cols., 1997; Jost y cols., 1997; De Laurenzi y cols., 1998; Ueda y cols., 2001) aunque no parece seguir la definición clásica del modelo de Knudson de inactivación génica. También se ha postulado que una isoforma de p73 que ha perdido el dominio con actividad transactivadora ($\Delta Np73$) tendría función oncogénica, por unión homodimérica y heterodimérica con p73 y p53 respectivamente, lo que inhibiría la actividad de ambas proteínas (Melino y cols., 2002).

Solo el estudio de un mayor número de tumores podrá definir más claramente el papel que juegan los posibles oncosupresores localizados en 1p.

De entre los genes localizados en 10q y analizados en meningiomas destaca *PTEN (MMAC1)*, situado en 10q23.3, si bien no se han encontrado mutaciones ni deleciones en homocigosis en este tipo tumoral (Boström y cols., 1998). Localizado en 10q25, se encuentra *MXII*, del que no hay estudios extensos en meningiomas, pero en el que se han encontrado mutaciones en otro tipo de tumores (Eagle y cols., 1995).

A pesar de que el mayor número de estudios se han centrado en el análisis mutacional y la expresión de GST, también se ha detectado en meningiomas, con cierta

frecuencia, la expresión anómala en algunos oncogenes. Se ha relacionado el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*) y su receptor con el desarrollo y el mantenimiento de meningiomas (Maxwell y cols., 1990). También se han encontrado altos niveles del oncogén *ROSI*, que pertenece a la superfamilia de los receptores de tirosina kinasa, en estas neoplasias (Zhao y Sharma, 1995). La proliferación de líneas celulares provenientes de meningiomas esporádicos es dependiente de la presencia de proteínas Ras funcionales según el estudio realizado por Shu y cols. (1999). Los estudios de Detta y cols. (1993) demostraron correlación positiva entre la desregulación de *c-myc* y los niveles de proliferación en meningiomas atípicos y anaplásicos. Resultados parecidos fueron obtenidos, respecto a la expresión de *erbB-2*, por Chozick y cols. (1996).

El fenómeno de la metilación sucede de forma natural en el ADN cromosómico y consiste en la adición de un grupo metilo a algunas Citosinas de las situadas en secuencias de dinucleótidos CG. En la célula normal entre el 3 y el 4% de todas las Citosinas están metiladas, pero la distribución de esta metilación es propia de cada tipo celular (Esteller y Herman, 2002). Aproximadamente el 60% de los genes humanos contienen en su extremo 5' (regulador) regiones ricas en dinucleótidos CG (islas CpG) (Larsen y col., 1992). En la mayor parte de los casos descritos hasta el momento, la metilación de estas regiones o sitios reguladores de un gen, reducen a éste al silencio (Razin, 1998).

En las células cancerosas el estado de metilación global es hipometilado (Chen y cols., 1998), aunque las regiones reguladoras de ciertos genes, como los GST, están hipermetiladas (Herman, 1999; Baylin y Herman, 2000). La hipermetilación de las regiones reguladoras, representa una alternativa a la alteración genética para el proceso

de inactivación génica de los GST. Esta hipermetilación esta generalmente asociada a una inactivación de los GST (Jones, 1996; Baylin y cols., 1998). Los estudios en este campo son múltiples y abarcan genes que codifican para:

- Proteínas reparadoras de ADN como las codificadas por el gen *MGMT* (Pieper y cols., 1996; Esteller y cols., 1999; Danam y cols., 1999; Nakamura y cols., 2001; González-Gómez y cols., 2003a; Alonso y cols., 2003), el gen *hMLH1* (Kane y cols., 1997; Herman y cols., 1998; Esteller y cols., 1998 y 1999; Fleisher y cols., 1999) o el gen *BRCA1* (Dobrovic y cols., 1997; Catteau y cols., 1999; Esteller y cols., 2000b).
- Genes relacionados con factores hormonales, como el gen del receptor de estrógeno (*ER*) (Lapidus y cols., 1996; Li y cols., 1998; Carroll y cols., 1999; Li y cols., 2000).
- Genes reguladores del desarrollo celular, la diferenciación y la apoptosis, como el gen *TP73*, homólogo de *TP53* (Corn y cols., 1999; González-Gómez y cols., 2003a; Alonso y cols., 2003).
- Genes que controlan negativamente el ciclo celular como son *RBI*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* y *p15^{INK4b}* (Wong y cols., 1999; Xing y cols., 1999; Esteller y cols., 2000d; Simpson y cols., 2000; Wolter y cols., 2001; González-Gómez y cols., 2003a y 2003b; Alonso y cols., 2003).

Recientemente se ha relacionado la hipermetilación en el promotor del gen *NF2* con la inactivación de este gen oncosupresor (Kino y cols., 2001; González-Gómez y cols., 2003c). Mediante un análisis por Northern blot se demostró la ausencia de expresión del gen *NF2* en todos los schwannomas que presentaban un patrón de metilación alterado en el promotor de este gen (Kino y cols., 2001).

El estudio de los tumores del SNC, más concretamente de los meningiomas, ha ayudado a esbozar una respuesta sobre la etiología de las neoplasias en general. Toda la acumulación de información, citogenética y molecular, en este campo ha generado nuevas hipótesis sobre los orígenes y causas del cáncer así como la progresión a formas más agresivas. Las incógnitas pendientes, así como las metodologías surgidas en los últimos tiempos justifican la necesidad de estudios como este.

2.- OBJETIVOS

Los estudios citogenéticos y mutacionales no han conseguido explicar la génesis de una parte de los meningiomas a través de la pérdida total o parcial de un cromosoma 22 y la subsiguiente pérdida de expresión, en el homólogo, del gen *NF2* (22q12.2). Aunque se ha asociado la pérdida de heterocigosidad en otros cromosomas con la progresión tumoral hacia formas de grado II y III, hasta ahora no se han identificado con claridad de entre los posibles genes candidatos aquellos responsables de esta progresión. Por todo esto, las incógnitas planteadas sobre la patogénesis de un subgrupo de meningiomas y la localización de genes supresores de tumor en 1p, relacionados con la evolución hacia formas más agresivas, justifican la necesidad de estudios en este sentido.

Por lo tanto los objetivos concretos de este trabajo han sido:

1. Análisis mutacional en genes localizados en 22q y en 1p con la intención de identificar el papel que juegan cada uno de ellos en la génesis y progresión de este tipo de neoplasia.
2. Análisis epigenético de las islas CpG del promotor del gen *NF2*, para intentar explicar la pérdida de expresión de este gen a través de mecanismos alternativos al clásico de mutación más delección.
3. Definir un patrón de metilación representativo de meningiomas.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

En este estudio se han utilizado un total de 105 meningiomas esporádicos junto con su correspondiente sangre periférica, y dos muestras de meninge normal como control de tejido.

El protocolo seguido para la obtención de las muestras fue el siguiente: se extraen 5 ml de sangre anticoagulada con heparina o EDTA, mientras que las muestras de tumor se recogen en seco, tras su extirpación. Ambas se congelaron en nitrógeno líquido dentro de crioviales, siendo éstos mantenidos a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

Los meningiomas se clasifican histológicamente, siguiendo los criterios establecidos por la OMS (Kleihues y cols., 2000) en:

- 74 Transicionales.
- 5 Fibromatosos.
- 21 Meningoteliales.
- 4 Psamomatosos.
- 1 Fusiforme.

En función del grado de desdiferenciación (Kleihues y cols., 2000) las muestras quedaron divididas en:

- 75 meningiomas grado I (típicos).
- 27 meningiomas grado II (atípicos).
- 3 meningiomas grado III (anaplásicos).

El contenido tumoral fue estimado, por examen histológico, en al menos el 75% de cada muestra.

Un resumen de estas clasificaciones de la serie de 105 meningiomas que hemos analizado, junto con las realizadas según el sexo y la edad se presentan en la Tabla I. Como se puede ver en ella para dividir la serie según la edad se ha utilizado los 50 años como límite entre ambos grupos ya que es a partir de esta edad cuando la incidencia de meningiomas en la población es mayor (Kleihues y col., 2000).

Tabla I.- Clasificaciones de los 105 meningiomas utilizados en este estudio.

Tipo Histológico		Grado de Malignidad		Sexo ^(a)		Edad ^(a)	
Transicional	74	Grado I	75	♀	71	(≤ 50 años)	36
Meningotelial	21	Grado II	27	♂	34	(> 50 años)	69
Fibromatoso	5	Grado III	3				
Psammomatoso	4						
Fusiforme	1						

(a) → Características del paciente.

3.2.- MÉTODOS.

3.2.1.- Obtención y dosaje de ADN genómico.

El ADN de alto peso molecular se extrajo, tanto de las muestras tumorales, tejido sano como de leucocitos de sangre periférica, mediante métodos estándar establecidos en el laboratorio (Rey y cols., 1992), utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA). Estos consisten en:

- a) Lisis celular y nuclear. Se puede añadir una digestión con RNAsa.
- b) Eliminación de las proteínas por precipitación.
- c) Precipitado del ADN con Isopropanol.
- d) El ADN se rehidrata, para su utilización, con una solución de 10 mM Tris y 1 mM EDTA (TE), a 4°C durante toda la noche. Este ADN se debe conservar entre 2 y 8°C. El ADN no utilizado se conserva a -25 °C.

La concentración del ADN fue cuantificada por espectrofotometría, midiendo la absorción a una longitud de onda (λ) de 260 nm (A_{260}). La medida de concentración se obtuvo considerando que una unidad de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de doble cadena.

También se determinó la pureza de las muestras utilizando la relación entre la A_{260} , y la A_{280} , siendo el valor óptimo para el ADN de 1,8.

3.2.2.- Ensayos realizados con el ADN.

3.2.2.1.- Análisis Mutacional.

Se analizaron las secuencias codificantes y las regiones relacionadas con el mecanismo de splicing de los genes: *NF2*, *INI1^{hSNF5}*, *TP73* y *p18^{INK4c}*. Las técnicas utilizadas fueron, el análisis del polimorfismo en la conformación de la cadena sencilla del ADN basado en la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR-SSCP) y la posterior secuenciación bidireccional automática.

3.2.2.1.1.- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizó para realizarla un termociclador MJ Research. Inc. PTC-100TM. La mezcla de reacción empleada fue:

- ADN molde 100 ng.
- Tampón de PCR 10 x (1x es Tris.HCl 75 mM (pH 9,0), MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂ SO₄ 20 mM).
- Mezcla de los cuatro dNTPs a 100 μM c/u.
- Los cebadores (sentido y antisentido) 10 μM c/u.
- ADN polimerasa termoestable de BIOTOOLS 1U/μl.
- Agua estéril hasta completar los 20 μl de volumen final de reacción.

En esta amplificación se desnatura previamente el ADN durante 5' a 94°C, tras lo cual se le somete a un programa de 35 ciclos consistentes en: etapa de desnaturalización, 94°C durante 30''; una etapa de anillamiento a una temperatura variable según la T_m de los cebadores utilizados también de 30'' y por último una etapa de elongación a 72°C durante 90''. Finalmente, se somete el amplificado a una elongación de 8' a 72°C.

Se amplificó el ADN empleándose: los cebadores de los 17 exones del gen *NF2* descritos por Rouleau y cols. (1993) y Jacoby y cols. (1996) que se detallan en la Tabla II; los 9 del gen *INI1^{hSNF5}* que aparecen detallados en la Tabla III y fueron suministrados gentilmente por la Dra. Jaclyn A. Biegel (School of Medicine, University of Pennsylvania); los cebadores de los 13 exones del gen *TP73* cuyas secuencias se describen en Yoshikawa y cols. (1999) y se presentan en la Tabla IV y los cebadores de los exones 2 y 3 del gen *p18^{INK4c}* descritos en Husemann y cols. (1999) detallados también en la Tabla IV. En general, estos cebadores han sido diseñados para incluir tanto la zona codificante como las contiguas, relacionadas estas últimas con el mecanismo de splicing.

La verificación del producto amplificado se realiza mediante electroforesis en gel horizontal de Agarosa al 2%, con Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración de 10 mg/ml, en tampón de Tris Borato EDTA (TBE) 1x. Se utiliza un marcador de peso molecular pBR322/BsuR1(Hae III) a una concentración de 0,5 mg/ml de BIOTOOLS. Las muestras, mezcladas con buffer de carga tipo IV (6x) (Sambrook y cols., 1982), se dejan migrar durante 1 hora, a un potencial eléctrico de 90 v. El resultado se visualiza y fotografía en un transiluminador de luz ultravioleta.

Tabla II .- Cebadores y condiciones de PCR y SSCP para el análisis del gen *NF2*.

EXÓN	Tamaño Amplificado	Secuencia del Cebador	Temperatura Anillamiento	SSCP % Acrilamida
1	236	5'-GCTAAAGGGCTCAGAGTGCAG-3' 5'-GACAACCTCTCGAGCTTCCAC-3'	57°	6
2	200	5'-TTGCTCACAGTGTCCCTTCCC-3' 5'-TCAGCCCCACCAGTTTCATC-3'	62°	12
3	275	5'-GCTTCTTTGAGGGTAGCACA-3' 5'-GGTCAACTCTGAGGCCAACT-3'	63°	12
4	188	5'-CCTCACTTCCCCTCACAGAG-3' 5'-CCCATGACCCAAATTAACGC-3'	62°	10
5	173	5'-ATCTTTAGAATCTCAATCGC-3' 5'-AGCTTTCTTTTAGACCACAT-3'	57°	12 +10% Glicerol
6	181	5'-AAACAATACCAAATTTACTTCATG-3' 5'-GCCCATAAAGGAATGTAAACC-3'	49°	8
7	174	5'-CCATCTCACTTAGCTCCAATG-3' 5'-CTCACTCAGTCTCTGTCTAC-3'	57°	12 +10% Glicerol
8	248	5'-GAAGGTTGAATAAAAATTTTGAGCCTC-3' 5'-GACAGGGAAAGATCTGCTGGACC-3'	58°	12
9	138	5'-GTTCTGCTTCATTCTTCC-3' 5'-GTAATGAAAACCAGGATC-3'	48°	12 +10% Glicerol
10	166	5'-CCTTTTAGTCTGCTTCTG-3' 5'-TCAGTTAAAACAAGGTTG-3'	48°	12 +10% Glicerol
11	212	5'-TCGAGCCCTGTGATTCAATG-3' 5'-AAGTCCCCAAGTAGCCTCCT-3'	63°	10
12	284	5'-CCCCTCAGCTAAGAGCAC-3' 5'-CTCCTCGCCAGTCTGGTG-3'	63°	12 +10% Glicerol
13	227	5'-GGTGTCTTTTCCTGCTACCT-3' 5'-GGGAGGAAAGAGAACATCAC-3'	60°	12
14	197	5'-CTGTGCTTGTATGACCCAAG-3' 5'-AGGGCACAGGGGGCTACA-3'	62°	12
15	245	5'-TCTCACTGTCTGCCAAG-3' 5'-GATCAGCAAATAACAAGAAA-3'	54°	8
17	212	5'-AGGACCCTGTAGACAGAG-3' 5'-CCAGCCAGCTCCTATGGATG-3'	57°	12 +10% Glicerol
16(*)	148	5'-GGCATTGTTGATATCACAGGG-3' 5'-GGCAGCACCATCACCACATA-3'	58°	12

(*) → Este exón aparece por splicing alternativo en la Isoforma II de la proteína (merlin).

Tabla III.- Cebadores y condiciones de PCR y SSCP para el análisis del gen *INI1^{hSNF5}*.

EXÓN	Tamaño Amplificado	Secuencia del Cebador	Temperatura Anillamiento	SSCP % Acrilamida
1 (*)	438	5'-ACTGAGGGCGGCCTGGTCGT-3' 5'-CGACACGCCCACTAGGCCAC-3'	68°	8
2	234	5'-CTGCGACCCTTATAATGAGC-3' 5'-GCGACTGGTTTTGAAACAGG-3'	60°	10
3	205	5'-ACCAGCAGAGTGACCCAGTG-3' 5'-AGAGATGCCCTGGCCAGGAA-3'	64°	10
4	245	5'-GGATCAGGTCCTATACTGAC-3' 5'-AACTAAGGCGGAATCAGCAC-3'	60°	10
5	221	5'-TCGCTGACTGTTGCTTCCAT-3' 5'-ACTGTTCCCACGTAACACAC-3'	60°	10
6	277	5'-TGGTGCAATCTCTTGGCATC-3' 5'-TCAGTGCTCCATGATGACAC-3'	60°	12
7	312	5'-TGGGCTGCAAAAAGCTCTAAC-3' 5'-CGCTCACACAGAGAAGTCTT-3'	60°	12
8	312	5'-ATCCACTGGGTGCCAGCAGT-3' 5'-TCTGCCTGGAAAGCCAGGTG-3'	64°	12
9	200	5'-CCCTGTAGAGCCTTGGGAAG-3' 5'-GCCTCTGTCCTTGCCAGAAG-3'	64°	10

(*) → En este exón se añade un 5% de DMSO (dimetil sulfóxido) a la mezcla de reacción, para eliminar inespecificidades y mejorar la calidad del amplificado.

Tabla IV .- Cebadores y condiciones de PCR y SSCP en el análisis de *TP73* y *p18^{INK4c}*.

EXÓN	Tamaño Amplificado	Secuencia del Cebador	Temperatura Anillamiento	SSCP % Acrilamida
2	163	5'-TGCAGAGCGAGCTGCCCTCGGA-3' 5'-AGGCTAGCCCAGAGTGCCTCCCA-3'	67°	12
3	211	5'-TGACACCCAAACTGGGGACTGA-3' 5'-CCACTCCAGTCTCTTGCAGA-3'	57°	12 +10% Glicerol
4	316	5'-GACGACTGACTGTGTGTGTTTC-3' 5'-CTCAGGGACTAGGGGAAGTC-3'	55°	10
5	279	5'-CAGTTGGGACCACTGGTCTCA-3' 5'-ATGCTGGGCAAAGTGCCACCGT-3'	61°	12 +10% Glicerol
6	209	5'-ACCTCTATGCACCTCTCTGAAG-3' 5'-GACCCGTACAGCTGACTGCA-3'	57°	6
7	248	5'-TTGGGGCTGCGTGCTGATGCTA-3' 5'-CCTGCAGGTCTCCATGACAGCT-3'	62°	12
8	223	5'-CAGGGTTGAGCTCACAATTCTG-3' 5'-TCCTCCCACACGCGTCCAGTT-3'	57°	6
9	190	5'-ACCCTCTGGTCTGCCTGCTCA-3' 5'-ACGACAGAGGTGAGGCAGGTCT-3'	61°	6
10	181	5'-AGAGATCTGCTCCTCTGTGCTCA-3' 5'-TTCCCCACACTGATGGTGGGCTA-3'	60°	10
11	399	5'-AGGCTCCACCCATTCGCAGCA-3' 5'-CCTCCTGCCAGAGGGTGGAA-3'	62°	12
12	233	5'-TGGATGCCAGCCTGGCTGCCCTGAT-3' 5'-CAGACAGGGTGACAGCACATGCTCAG-3'	68°	12
13	251	5'-AGCCAGGCCACTCTCAGAGAT-3' 5'-AAGGCTCTTTGCCCTCCGGACA-3'	60°	8
14 (+)	424	5'-TCCACTGCCCCCTGCCCTAAT-3' 5'-AGGCAGCTTGGGTCTCTGGGCGGT-3'	66°	6 +10% Glicerol
<i>p18^{INK4c}</i>				
2	405	5'-CGACTAATTCATCTTTTCCTG-3' 5'-TTATTGACTTGTTTTCCCCAC-3'	58°	10
3	209	5'-AGGATTCTACCATTTCTACTTCTTT-3' 5'-TTATTGAAGATTTGTGGCTCCCCCA-3'	69°	10

(+) → En este exón la poliacrilamida utilizada fue 29:1, el amplificado se testó en minigeles a 150 voltios entre 60 y 90 minutos.

3.2.2.1.2.- Polimorfismo en la conformación de la cadena sencilla (SSCP)

Esta metodología permite la detección de mutaciones y polimorfismos, aunque no su caracterización. El amplificado se desnatura y se hace migrar en un gel de Acrilamida: bis-Acrilamida (37,5:1), en condiciones no desnaturizantes. El método está basado en los cambios de movilidad electroforética de las cadenas sencillas de ADN en el gel de poliacrilamida debido a las modificaciones, en su conformación y plegamiento, que producen las variaciones en la secuencia de nucleótidos (Orita y cols., 1989, Hayashi, 1991).

También se carga una muestra sin desnaturizar como control del patrón que presenta la banda del heteroduplex, pues se ha demostrado que en ella también se pueden encontrar variaciones. Estos cambios, en la conformación y el plegamiento, se deben a modificaciones en la estructura tridimensional por un mal emparejamiento de la doble cadena. Su consecuencia es un patrón de migración del heteroduplex distinto al del ADN normal (White y cols, 1992).

De los 20 µl obtenidos de amplificado, se toman tres y un volumen igual de buffer de carga que contiene formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromo fenol 0,05%, xileno cianol 0,05% y agua estéril. La mezcla se desnatura a 95 °C durante 5' y se carga en el gel de poliacrilamida. Los porcentajes de poliacrilamida utilizados se incluyen en las Tablas II, III y IV. El potencial eléctrico y el tiempo de electroforesis varían según el gen y el exón de que se trate pero, por lo general, es de 10 vatios durante un tiempo de 2 a 6 horas. En aquellos exones en los que se le añade un 10% de Glicerol las condiciones de migración fueron: 16 h a un potencial eléctrico de 10 vatios.

El revelado de los geles se realiza utilizando el método de la tinción de plata que comprende, una fijación con solución de etanol: ácido acético en proporción 3 a 1; una

impregnación con una solución de nitrato de plata (6 gr/l) y formaldehído (0,1%), condiciones desnaturalizantes, y un revelado con una solución de carbonato sódico (150 gr/l), formaldehído (0,1%) y tiosulfato sódico (0,07%). El proceso de revelado se detiene mediante una solución de ácido acético al 1%. Finalmente, se transfiere el gel a un papel Watman 3MM Chr, para su secado (una hora a 80°C). Tanto la migración de los geles como los métodos de tinción utilizados aquí siguen los protocolos descritos por Bender y cols. (1993).

3.2.2.1.3.- Secuenciación automática del ADN

Aquellas muestras que presentan un patrón de movilidad anormal son reamplificadas, purificadas y secuenciadas bidireccionalmente para definir la variación en la secuencia de ADN.

Para esto, primero se realizó una amplificación de las muestras a estudiar, utilizando los cebadores descritos anteriormente, en un volumen final de 50 µl. El producto amplificado se hizo migrar en un gel horizontal de Agarosa Nusieve[®] GTG[®], de bajo punto de fusión (BMA), al 2%. Se purificó el ADN mediante el kit de purificación por columnas de QIAquik[®], que poseen membranas de sílice para retener el ADN tras elusión selectiva a diferentes concentraciones salinas.

El ADN purificado se utiliza como molde para la secuenciación, siguiendo el protocolo de ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit el cual marca fluorescentemente la hebra que se va a amplificar (Perkin Elmer, Alameda, CA). El fragmento es secuenciado en ambas direcciones en un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 de Applied Biosystems.

Cada una de las dos hebras se reamplifica de forma independiente, utilizando los

cebadores correspondientes, ya descritos en las Tablas II, III y IV. En esta amplificación se desnatura previamente el ADN durante 3' a 94° C, tras lo cual se somete al ácido nucleico a un programa (desnaturalización, anillamiento y extensión) de 25 ciclos. Por último se precipita el ADN con una solución de acetato sódico.

3.2.2.2.- Análisis Epigenético.

El grado de metilación en los genes en estudio (*MGMT*, *TP73*, *RB1*, *DAPK* (proteína quinasa asociada a muerte celular), *ER*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*, *TIMP3* (inhibidor de tejido por la metaloproteinasa 3), *THBS1* (tromboespondina 1) y *NF2*) se analizó utilizando la metodología MSP (PCR específica de metilación) descrita por Herman y cols. (1996).

Las muestras de ADN genómico se modificaron con bisulfito sódico, el cual convierte todas las Citosinas no metiladas en Uracilos, para a continuación realizar una amplificación con cebadores específicos para ADN metilado y no metilado. Esta técnica requiere una muy pequeña cantidad de ADN y es muy sensible a la presencia del alelo metilado. Más detalladamente, la técnica consta de los siguientes pasos:

A) Modificación del ADN genómico con bisulfito sódico.

- Se parte de 2 µg de ADN en un volumen de 70 µl de agua.
- Se desnatura este con NaOH 3M (8 µl). Incubándose 15' a 37°C y 5' a 94°C. Enfriándose en hielo inmediatamente.
- Tratamiento con bisulfito. Se preparan tres soluciones en el momento de utilizarlas:

Solución A: Se disuelven 8,1 g de bisulfito en 15 ml de agua estéril, guardándolo en oscuridad.

Solución B: Se diluyen 0,110 g de hidroquinona en 25 ml de agua estéril.

Solución C: Se prepara mezclando 1 ml de solución B a la solución A, añadiendo 600 µl de NaOH 10M.

Se añade 1 ml de la solución C a cada muestra y se mezcla suavemente.

- Se cubre la muestra con 4 o 5 gotas de aceite mineral para evitar que se evapore. Se incuban al menos 16 h a 55-56 °C en oscuridad.

B) Purificación del ADN modificado.

- Se parte de 500 µl de ADN tratado. El resto se guarda a 4 °C.
- Se añade 1 ml de resina del kit, Wizard® DNA Clean-Up System, Promega Madison, WI, a este ADN. La resina captura el ADN reteniéndolo en la minicolumna con la ayuda del vacío creado.
- Se lava la columna con 2 ml de isopropanol 80%, mientras se mantiene el vacío.
- Para eliminar el exceso de isopropanol se centrifuga a 13.000 rpm durante dos minutos.
- Para recuperar el ADN se le añaden 40 µl de agua estéril y se centrifuga 30". Este paso se repite una segunda vez tras lo que se deshecha la minicolumna.
- El ADN, ya purificado, se vuelve a desnaturalizar añadiendo 8 µl de NaOH 3M (10% volumen) y se incuba a 37°C durante 15'.
- Se precipita el ADN y se resuspende en 30 o 40 µl de agua.

Este ADN tratado es el que se utiliza para realizar la amplificación con la que se testará el grado de metilación de las muestras. Para ello se utilizan los "juegos" de cebadores que han sido descritos por: Simpson y cols. (2000) para *RBI*; Corn y cols.

(1999) para *TP73*; Woong y cols. (1999) para *p16^{INK4a}*; Xing y cols. (1999) para *p14^{ARF}*; Hoon Kang y cols. (2001) para los genes *DAPK*, *THBS1* y *TIMP3*; Zöchbauer-Müller y cols. (2001) para *MGMT*; Lapidus y cols. (1998) para *ER*; Kino y cols. (2001) para el gen *NF2* (Tabla V).

La reacción utilizada es la misma que se ha explicado en el apartado 3.2.2.1.1 referido a la técnica de PCR. El programa de amplificación consta de los mismos pasos descritos ya en ese mismo apartado salvo que la adición de la Polimerasa se realiza tras una desnaturalización de 5' (Hot Start) y el número de ciclos de que consta el programa pasan a ser 40 en vez de los 35 habituales.

Los controles utilizados en esta metodología fueron:

- Control negativo, muestras de ADN procedente de sangre periférica, a las que se trató como al resto de los tumores utilizados en el estudio.
- Control positivo, muestras de ADN procedente de sangre periférica, a las que se trató previamente con una CpG Metilasa (Sss I Metilasa) de *New England BioLabs_{Inc.}* aplicando el protocolo que describe el proveedor, con el fin de conseguir que todas las islas CpG estuviesen metiladas. Tras el tratamiento con Metilasa los controles positivos siguieron el mismo proceso que el resto de las muestras.
- Control del estado normal de metilación del tejido. Se utilizó ADN procedente de dos muestras de tejido de meninge normal. El tratamiento es el mismo que el seguido con las muestras tumorales.

Tras la amplificación y para comprobar el estado de metilación de la muestra, se realiza una electroforesis en gel horizontal de agarosa como se describe en el apartado 3.2.2.1.1. La excepción es el gen *TP73* que se testó haciendo migrar el amplificado en

minigeles verticales de Acrilamida: bis Acrilamida (37,5:1) a un porcentaje de poliacrilamida del 12% durante 50 minutos a 150 voltios de potencial.

3.2.3.- Análisis Estadístico.

En el análisis estadístico de las muestras se han utilizado las pruebas χ^2 (Chi-cuadrado) con la corrección de Yates, o el test de Fischer exacto (si la frecuencia esperada es menor de 5) para comparar diferencias de proporciones entre grupos (Lamotte, 1984; Walpone y Myers, 1992). El test de la t de Student para comparar diferencias entre medias y el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar distribuciones de rangos entre grupos de tamaño reducido (Lamotte, 1984; Walpone y Myers, 1992).

Para medir el estado general de metilación en cada una de las muestras se ha definido la variable Índice de Metilación por muestra (IM). Este índice se define como:

$$IM = \frac{\text{n}^\circ \text{ de genes hipermetilados}}{\text{n}^\circ \text{ de genes testados}}$$

A partir de este índice se puede calcular el índice de metilación por grupo para comparar los estados generales de metilación entre ellos.

Tabla V.- Secuencias de cebadores, temperatura de anillamiento y tamaño de amplificado de los productos de PCR utilizados para la MSP.

CEBADOR	secuencia sentido 5' ----- > 3'	secuencia antisentido 5' ----- > 3'	Tmño. (pb)	Temperatura Anillamiento
<i>MGMT</i> – M(+)	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	81	66
<i>MGMT</i> – U(+)	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	93	66
<i>TP73</i> – M	GGACGTAGCGAAATCGGGGTTTC	ACCCCGAACATCGACGTCCG	60	67
<i>TP73</i> – U	AGGGGATGTGTAGTGAAATTGGGGTTT	ATCACAACCCCAAACATCAACATCCA	69	65
<i>RBI</i> – M	GGGGAGTTTCGCGGACGTGAC	ACGTCGAAACACGCCCCG	172	66
<i>RBI</i> – U	GGGAGTTTTGTGGATGTGAT	ACATCAAAACACACCCCA	172	58
<i>DAPK</i> – M	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	CCCTCCCAAACGCCGA	98	66
<i>DAPK</i> – U	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106	65
<i>ER</i> – M	CGAGTTGGAGTTTTTTGAATCGTTC	CTACGCGTTAACGACGACCG	151	63
<i>ER</i> – U	ATGAGTTGGAGTTTTTTGAATTGTTT	ATAAACCTACACATTAACAACAACCA	158	63
<i>p16^{INK4a}</i> – M	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150	65
<i>p16^{INK4a}</i> – U	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151	65
<i>p14^{ARF}</i> – M	GTCGAGTTCGGTTTTGGAGG	AAAACCACAACGACGAACG	160	61
<i>p14^{ARF}</i> – U	TGAGTTTGGTTTTGGAGGTGG	AACCACAACAACAACACCCCT	165	65
<i>TIMP-3</i> – M	CGTTTCGTTATTTTTTGTTCGGTTTC	CCGAAAACCCCGCCTCG	116	60
<i>TIMP-3</i> – U	TTTTGTTTTGTTATTTTTTGTTCGGTTT	CCCCAAAAACCCACCTCA	122	60
<i>THBS1</i> – M	TGCGAGCGTTTTTTTTAAATGC	TAAACTCGCAAACCAACTCG	74	63
<i>THBS1</i> – U	GTTTGGTTGTTGTTTATTGGTTG	CCTAAACTCACAACCAACTCA	115	62
<i>NF2</i> – M	TAAAGGAGGCGGGACGGAGC	ACGCAACCGAACCGAAAACCTAACG	93	62
<i>NF2</i> – U	TAAAGGAGGTGGGATGGAGT	ACACAACCAAACCAAAAACCTAACA	93	59

(+) → (M) Cebador metilado, (U) cebador no metilado.

4.- RESULTADOS

4.1.- ANÁLISIS MUTACIONAL

4.1.1.- Genes localizados en 22q.

4.1.1.1.- Análisis del gen *NF2*.

Se realizó el análisis mutacional de los 17 exones de *NF2* en una serie de 105 meningiomas esporádicos utilizando los cebadores ya descritos en la Tabla II. En este gen se encontraron cambios de movilidad en los exones 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11, 12, 13 y 14. Las muestras alteradas así como los cambios en la secuencia de aminoácidos se presentan en la Tabla VI.

En la muestra T4 (grado I) se encontró un cambio polimórfico, una transversión $G > C$ en el codón 482, perteneciente al exón 13, y que mantenía el aminoácido codificado, una Prolina.

La única mutación de cambio de sentido se encontró en la muestra T73 (grado I), en el codón 211 perteneciente al exón 7 donde una transversión $C > A$ produce el cambio de una Alanina por un Ácido Aspártico (Figura 1A).

El meningioma atípico T65, presentó una delección de tres bases (CTT) en el exón 3 que producía la pérdida de un aminoácido (Phe 119).

Aparecieron dos mutaciones relacionadas con el mecanismo de splicing. En la posición +1 del intrón 7 del meningioma T136 (grado I recurrente), se localizó una transición $G > A$ en el par GT que forma el sitio donador del intrón y que es imprescindible para su procesado y eliminación. La otra mutación de este tipo se encontró en la posición +1 del intrón 13 en la muestra T39 (grado II). Se trató en este caso de una transversión $G > C$ también en el par de bases GT que forman la secuencia donante del intrón (Figura 1B).

Aparecieron 8 mutaciones sin sentido distintas, que producían codones stop, en un total de 11 meningiomas. Siete de ellas eran transiciones $C > T$. En el exón 2 se encontró una $C > T$ en el nucleótido 169 (Figura 2A), que corresponde al codón 57 de la proteína, en las muestras T18 (grado III), T38 y T58 (grado I). El meningioma T143 (grado II) presentó otra transición $C > T$ en el exón 10, que trunca la proteína. Otras tres mutaciones $C > T$ distintas se hallaron en el exón 11 de tres muestras de grado I (T9, T6 y T12) y una de grado III (T7). También se generó un codón stop en el triplete 400, del exón 12, en el meningioma típico T42, por transición $C > T$ en un triplete CAG. La última mutación de este tipo ($C > T$) se localizó en el exón 13 (Figura 2B) de la muestra T13 (grado II).

En el meningioma de grado II, T62 se encontró una transversión $C > G$ en el codón 481 (exón 13). Esta mutación producía también una proteína truncada.

Las mutaciones por cambios en el marco de lectura se debieron en su mayoría a pequeñas deleciones que producían proteínas truncadas. La deleción de las bases 41 y 42 del exón 1 (TC) en la muestra T77 (grado I) produce una proteína truncada en el codón 47. En el caso T36 (grado I) se pierde una G en el codón 89, del exón 3, que produce una señal stop en el triplete 122; también en el exón 3 la muestra T17 (grado II) pierde una C en el codón 91 que produce una señal de parada también en el codón 122. En el exón 4, la muestra T83 (grado II) presentaba una deleción de cuatro bases en los codones 143-144 (TTAC) que producía una señal de stop en el codón 172 (Figura 3A). En el exón 7 de la muestra T5 (grado II) la deleción fue de dos bases pertenecientes a los codones 206 y 207 (AT), truncándose la proteína en el resto 226.

En la muestra T44 (grado I) se detectó la deleción de 4 bases (GAGA) en los codones 445 y 446, del exón 12; esta alteración produjo un truncamiento de la proteína

en el codón 453. En el exón 13 se encontraron dos mutaciones de este tipo: la muestra T38 (grado I) presentaba la deleción de una C en el codón 479 que hacía interrumpirse la traducción en el 484; la otra mutación se encuentra en la muestra T53 (grado I) donde por deleción de una C en el último codón del exón se genera una señal stop en el codón 484. En el meningioma T138 (grado I) apareció un cambio de cuadro de lectura debido a la deleción de 14 bases entre los codones 491 y 496 del exón 14 (Figura 3B).

Por último se detectó una inserción de dos bases (TG) en el exón 12, del caso T125 (grado I). Esta alteración también produjo un truncamiento de la proteína en el codón 439.

En resumen, se encontraron 25 muestras con mutación (24%) del total de 105 meningiomas esporádicos estudiados. Los tipos de alteración más frecuentes fueron las que producían proteínas truncadas, bien por pequeñas deleciones que cambian el marco de lectura o por mutaciones sin sentido que producen un codón stop, en su mayor parte por sustituciones C > T en codones CAG y CGA. Ambos tipos con un porcentaje del 40%. Se encontraron dos mutaciones en la zona donadora del mecanismo de splicing (8%). Apareció solo una mutación de cambio de sentido (4%), así como una muestra con deleción dentro de marco de lectura (4%). Con esa misma proporción se detectó una mutación silenciosa en el gen *NF2* (Polimorfismo).

La proporción de mutaciones fue más alta en los meningiomas de alto grado (II y III) que en los de grado I, un 33% frente a un 20%, las diferencias no fueron significativas. Se encuentran diferencias significativas entre los subgrupos histológicos de meningiomas en cuanto a los porcentajes de mutación, en los transicionales es del 18% (13/74) y del 43% (9/21) en los meningoteliales. En esta serie también se analizó el parámetro sexo: en los meningiomas pertenecientes a individuos de sexo femenino un

32% estaban alterados y un 24% de los pertenecientes a individuos de sexo masculino presentaban alguna alteración. En cuanto a la incidencia de mutaciones según la edad, en la serie se han diferenciado dos grupos: el de mayores de 50 años y el de menores o iguales de esa edad con unos porcentajes de muestras mutadas del 31 y el 15% respectivamente. En ninguno de estos dos parámetros aparecieron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla VI.- Cambios de secuencia identificados en el análisis mutacional del gen *NF2*.

Exón / Intrón	Cambio Nucleotídico	Cambio de AA	Muestras
1	41-42 del TC	⁽⁺⁾ Leu 14 → 47X	T77
2	169 C > T	Arg 57 X	T18, T38, T58
3	265 del G	⁽⁺⁾ Glu 89 → 122X	T36
	271 del C	⁽⁺⁾ Pro 91 → 122X	T17
	357-359 del CTT	Pérdida Phe 119	T65
4	429-432 del TTAC	⁽⁺⁾ Ser 143 → 172X	T83
7	618 del AT	⁽⁺⁾ Glu 206 → 226X	T5
	632 C > A	Ala 211 Asp	T73
7 / + 1	G > A	Splicing Donor	T136
10	970 C > T	Gln 324 X	T143
11	1009 C > T	Gln 337 X	T9
	1021 C > T	Arg 341 X	T6, T7
	1084 C > T	Gln 362 X	T12
12	1198 C > T	Gln 400 X	T42
	1306-1307 ins TG	⁽⁺⁾ Ala 437 → 439X	T125
	1333-1336 del GAGA	⁽⁺⁾ Glu 445 → 453X	T44
13	1366 C > T	Gln 456 X	T13
	1435 del C	⁽⁺⁾ Pro 479 → 484X	T38
	1443 C > G	Tyr 481 X	T62
	1445 del C	⁽⁺⁾ Pro 482 → 484X	T53
	1446 G > C	Pro 482 Pro	T4
13 / + 1	G > C	Splicing Donor	T39
14	1472-1485 del 14 pb	⁽⁺⁾ Leu 491 → 492X	T138

(+) → Mutación de cambio de marco de lectura.

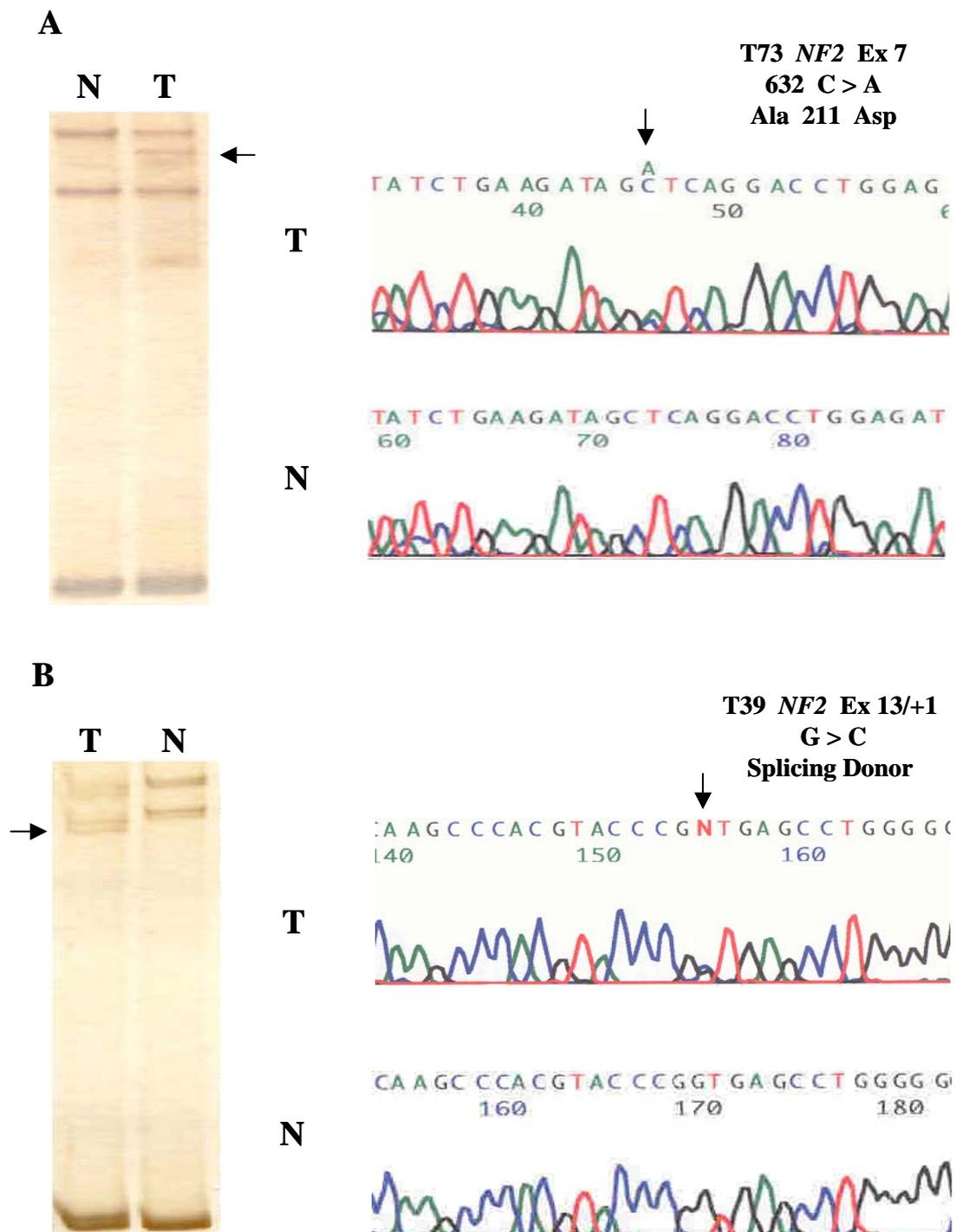


Figura 1.- (A) Mutación de cambio de sentido en el exón 7 de *NF2* por transversión C > A en la posición 632. (B) Mutación de splicing en la posición +1 del intrón 13 de *NF2*. A la izquierda y derecha se muestran respectivamente el análisis SSCP (banda de movilidad alterada o extra indicada con flecha) y las secuencias sentido (cambio nucleotídico señalado por una flecha) del ADN alterado (T) y del patrón normal (N).

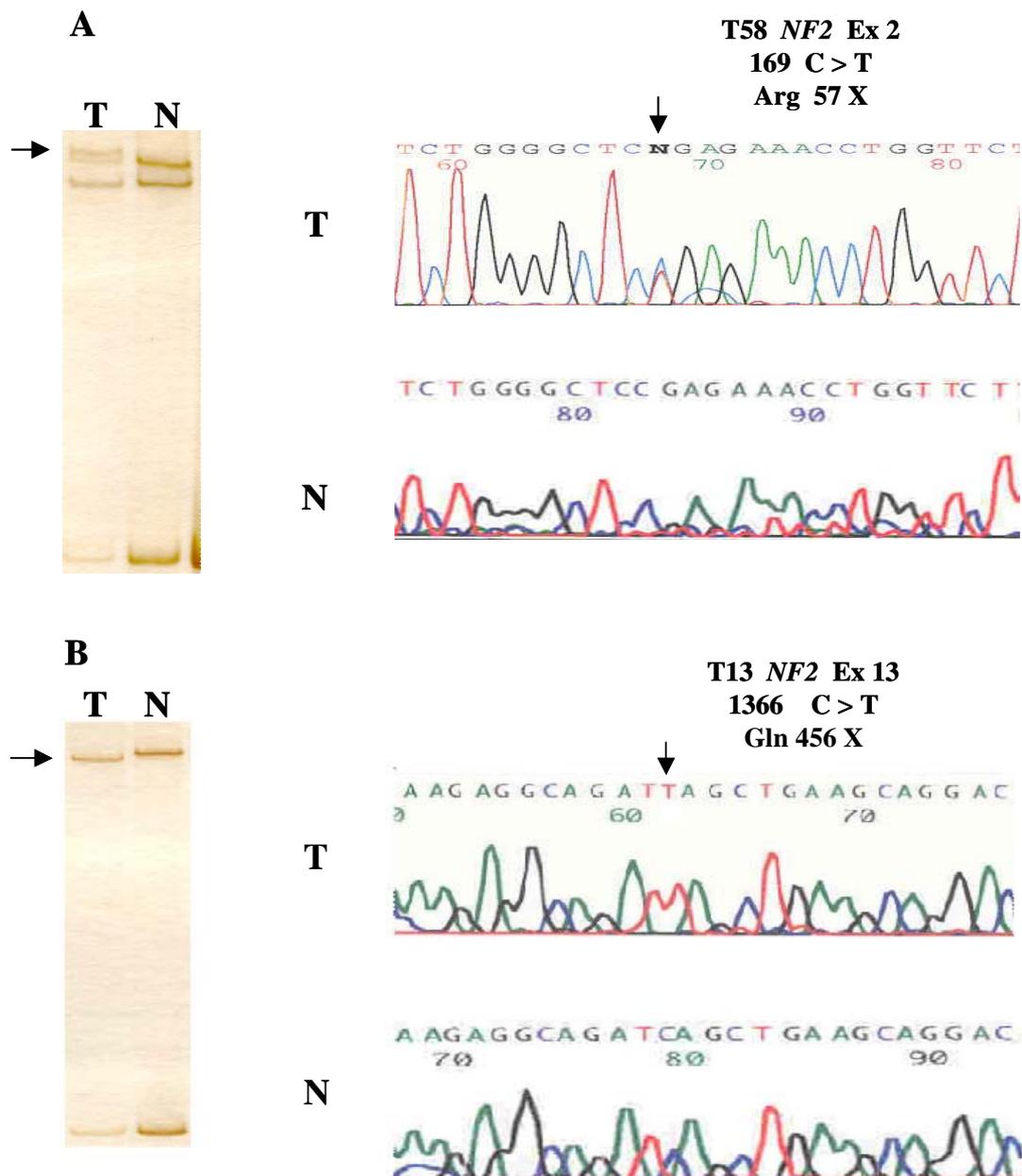


Figura 2.- Mutaciones sin sentido en los exones 2 y 13 del gen *NF2* por transiciones C > T. **(A)** En la posición 169 (E2) la presentaron los meningiomas T18, T38 y T58. **(B)** En la posición 1366 (E13) la presentó el tumor T13. A la izquierda y derecha se muestran respectivamente el análisis SSCP (banda de movilidad alterada o extra indicada con flecha) y las secuencias sentido (cambio nucleotídico señalado por una flecha) del ADN alterado (T) y del patrón normal (N).

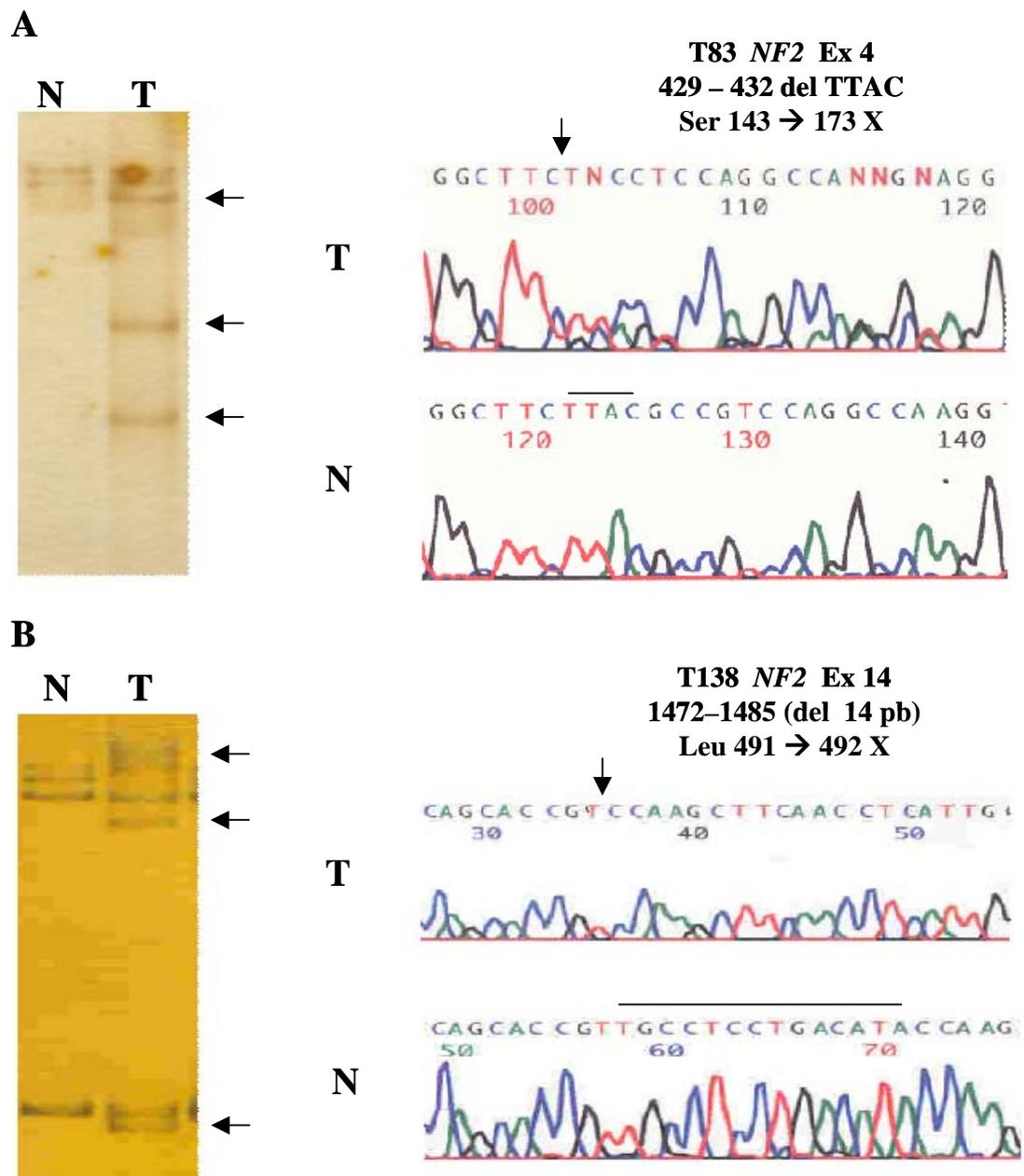


Figura 3.- (A) Mutación cambio de marco en el exón 4 de *NF2* por delección de 4 pb, en las posiciones 429 a 432, que produce el truncamiento de la proteína. (B) Mutación cambio de marco en el exón 14 de *NF2* por delección de 14 pb, en las posiciones 1472 a 1485. A la izquierda y derecha se muestran respectivamente el análisis SSCP (bandas extra indicadas con flechas) y las secuencias sentido (secuencia de bases delecionada, señalada con una línea en negro) del ADN alterado (T) y el patrón normal (N).

4.1.1.2.- Análisis del gen *INII*^{*hSNF5*}.

Se realizó el análisis mutacional de los 9 exones del gen *INII*^{*hSNF5*} en la misma serie de 105 meningiomas esporádicos utilizada en el estudio del gen *NF2*, con los cebadores ya descritos en la Tabla III, encontrándose cambios de movilidad en los exones 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9. En la Tabla VII se presentan las muestras en las que, tras secuenciación, apareció algún cambio en la secuencia de bases. También se señala el tipo de mutación y el cambio de aminoácido si lo hubo.

Lo primero que se debe señalar es la aparente discrepancia entre algunas de las secuencias observadas en nuestro estudio, en todos los tumores, con las correspondientes secuencias disponibles en el GeneBank (números de acceso U64847 y Y17118 – Y17126). En la Tabla VII se resaltan en negrita las posibles diferencias de secuencia. Éstas se localizaron en: el intrón 1 (1/+119) por delección GC, en el exón 4 una mutación cambio de sentido (Ser 136 Pro) en la base 408 por transición T > C (Figura 4A); las últimas discrepancias se encontraron en el exón 9, en las bases 1139-41 (GAA > CTT) y en el nucleótido 1152 (G > C) que producían los cambios de sentido Glu 378 Leu y Gly 382 Ala, respectivamente.

En el meningioma T130 (grado I) se detectó la sustitución G > T en el exón 1, que no producía cambio de aminoácido en el codón 14, tratándose por tanto de una mutación silenciosa. Se encontró también una transición G > A en la tercera base del codón 299, perteneciente al exón 7, que mantenía la Serina original. Este último polimorfismo apareció en el 88% de los meningiomas estudiados.

Se detectaron siete mutaciones distintas relacionadas con el mecanismo de corte de los intrones. En el intrón 1 se halló en la posición +119, y consistió en un cambio G > T detectado en el meningioma de grado I, T31 (Figura 4B). En la zona donante del

intrón 2 (2/+13), del tumor T29 (grado I) se detectó una sustitución $A > G$. Otra mutación de este tipo, en concreto la transición $T > C$, se localizó en la región aceptora del intrón dos (3/-9) de la muestra T32, de grado I. En el intrón 7 (7/+58) se encontró una inserción de dos adeninas. Esta variación de secuencia apareció con una frecuencia del 82% en los meningiomas estudiados. También en el intrón 7 (8/-122) del meningioma T124 (grado I) se localizó una transversión $A > C$. Por último, en el intrón 8 (9/-41), se detectó una transición $G > A$ en 7 de las muestras de nuestra serie de meningiomas.

Todas las mutaciones de cambio de sentido se encontraron en el exón 9. En la muestra T45, de grado II, se produce una transición $G > A$ que cambia la Arginina del codón 374 por Glutamina. El meningioma T29, de grado I, presentó un cambio $C > T$ en la primera base del codón 377, cambiando la Arginina original por una Cisteína. El meningioma T12, grado I recidivante, presentaba una transición $G > A$ localizada en la segunda base del codón 377 que producía un cambio de Arginina a Histidina (Figura 5).

La frecuencia de casos mutados para este gen fue del 12,4%, si no se consideran las posibles discrepancias entre la secuencia descrita en el GeneBank y la obtenida en nuestra serie para las tres localizaciones comentadas anteriormente.

En la serie de meningiomas estudiados se encontró diferencia en la incidencia de las mutaciones en uno u otro sexo, 16% en las pertenecientes a pacientes de sexo femenino y un 7% en las de sexo masculino. En cuanto a la edad, los dos grupos, mayores y menores de 50 años, presentaron unas frecuencias de mutación del 12% y del 16% respectivamente. Se encontraron diferencias de frecuencia entre distintos grados de malignidad, los meningiomas de grado I presentaron una frecuencia de mutación del 16% y en los de alto grado (II y III) ésta fue del 3,4%.

Tabla VII.- Cambios de secuencia identificados en el análisis mutacional del gen *INI1^{hSNF5}*.

Exón /Intrón	Cambio Nucleotídico	Cambio de AA	Muestras
1	93 C > T	Pro 14 Pro	T130
1 / + 119	G > T	Splicing Donnor	T31
1 / + 119	del GC	Splicing Donnor	100%
2 / +13	A > G	Splicing Donnor	T29
3 / - 9	T > C	Splicing Aceptor	T32
4	408 T > C	Ser 136 Pro	100%
7	902 G > A	Ser 299 Ser	88%
7 / +58	Ins. AA	Splicing Donnor	82%
8 / -122	A > C	Splicing Aceptor	T124
9 / -41	G > A	Splicing Aceptor	T12,T47,T53,T57,T73,T75,T80
9	1139-41 GAA > CTT 1152 G > C	Glu 378 Leu Gly 382 Ala	100%
9	1128 G > A	Arg 374 Gln	T45
9	1136 C > T	Arg 377 Cys	T29
9	1137 G > A	Arg 377 His	T12

En **negrita** se señalan las alteraciones de secuencia que discrepan del Gene Bank.

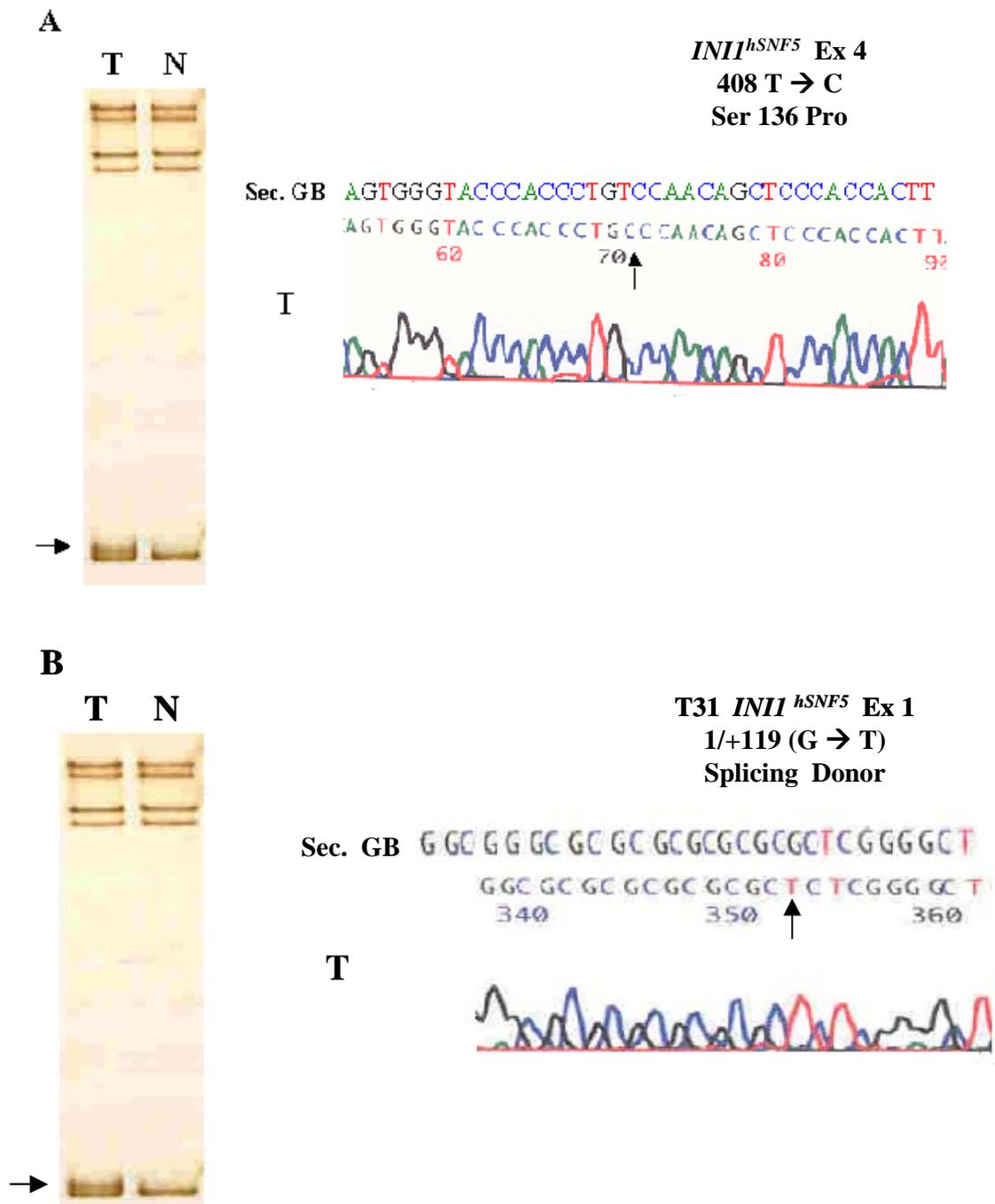


Figura 4.- (A) Discrepancia con la secuencia del GeneBank, localizada en la posición 408 del exón 4 de *INI1^{hSNF5}* que consistía en el cambio de T por C. (B) Mutación de splicing en la posición +119 del intrón 1 de *INI1^{hSNF5}*. A la izquierda se muestra el análisis SSCP del caso alterado, la banda extra (señalada por una flecha) se aprecia en el heteroduplex y del patrón normal de movilidad. A la derecha se muestran las secuencias sentido del ADN alterado (T) y la descrita en el GeneBank (alteración de la secuencia señalada por una flecha).

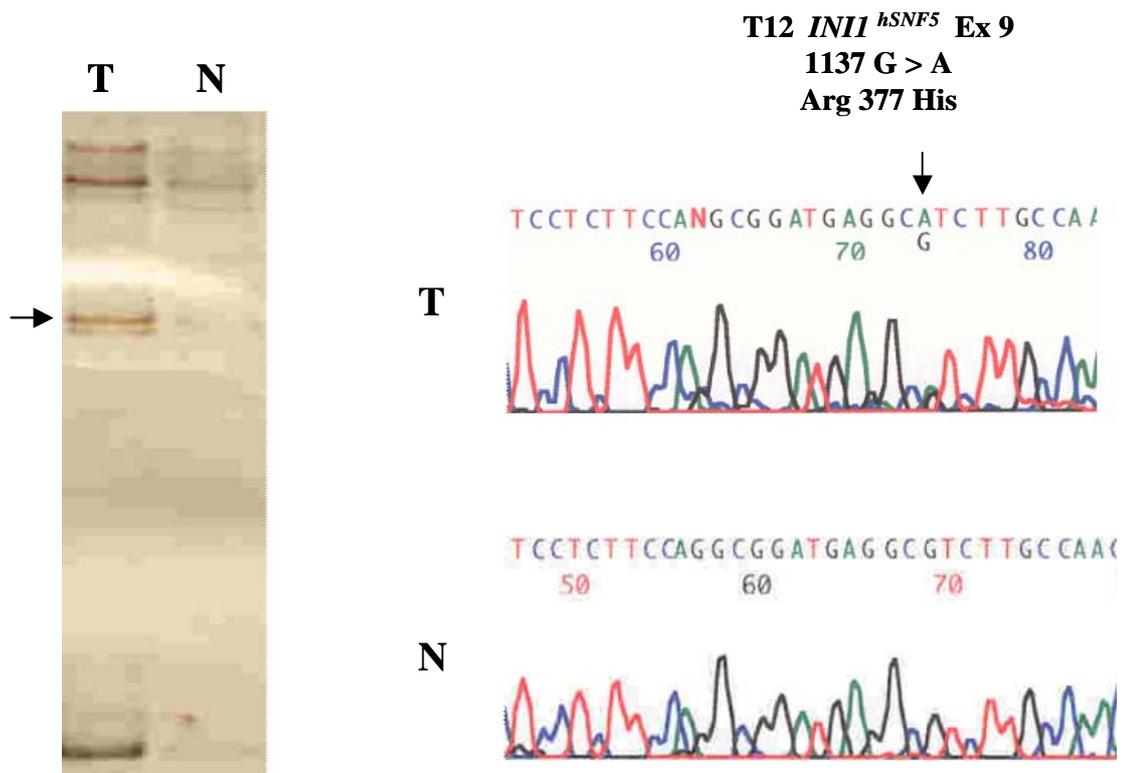


Figura 5.- Mutación de cambio de sentido en el exón 9 de *INI1* ^{hSNF5} por transición G > A en la posición 1137. A la izquierda y derecha se muestran respectivamente el análisis SSCP y las secuencias sentido del ADN alterado (T) y el patrón normal (N), banda extra y cambio nucleotídico señalados por flechas.

4.1.2.- Genes localizados en 1p.

El análisis mutacional de los genes localizados en el cromosoma 1, *TP73* (1p36.33) y *p18^{INK4c}* (1p32), se realizó en 30 de los 105 meningiomas de la serie, seleccionados en base a un estudio previo que había detectado la existencia de deleciones en distintas regiones de 1p.

4.1.2.1.- Análisis del gen *TP73*

Tras el estudio de los 13 exones del gen *TP73* utilizando los cebadores descritos en la Tabla IV, se encontraron cambios de movilidad en los exones 3, 5 y 9. El análisis mutacional mostró siete tipos de cambios, que se detallan en la Tabla VIII.

El número de casos en los que apareció algún cambio fue de nueve, lo que supone un 30% del total de muestras examinadas para este gen. Los cambios más frecuentes fueron las mutaciones silenciosas (Polimorfismo) presentes en ocho de los nueve tumores alterados y que estarían producidas por sustituciones de bases que no cambiaron el aminoácido codificado. Se detectó también una mutación de corte del intrón y una mutación de cambio de sentido.

Los polimorfismos se encontraron en los exones 5 y 9. En el exón 5 se detectó un doble cambio consistente en una transición G > A en el nucleótido 438 y una transición C > T en el nucleótido 612. Esta variación se identificó en cinco meningiomas, 3 de ellos de grado I (T6, T14, T79) y 2 de grado II (T16 y T83). En el exón 9 se detectó también un cambio nucleotídico doble, consistente en una transición C > T en el nucleótido 1008 (Figura 6A) y una transición T > C en la base 1047. Estas variaciones se identificaron en dos meningiomas de grado II (T11 y T30). Ninguna de estas sustituciones producidas en los exones 5 y 9 cambiaban el aminoácido codificado.

En la muestra T54 (grado II) se encontró, en el exón 5, un cambio polimórfico,

en concreto una transición T > C, en el nucleótido 519 sin que hubiera cambio del aminoácido Treonina 173. Además presentaba una mutación de cambio de sentido en el nucleótido 611, donde una transición A > G producía la sustitución del aminoácido Asparagina por Serina en el codón 204 (Figura 6B).

En la muestra T32 (grado I) se detectó la delección de una G en la posición +12 del intrón 3, en una zona relacionada con el mecanismo de procesado postranscripcional del exón.

Tabla VIII.- Cambios de secuencia identificados en el análisis mutacional del gen *TP73*.

Exón / Intrón	Cambio Nucleotídico	Cambio de AA	Muestras
3 / +12	delección G	Splicing Donnor	T32
5	438 G > A / 612 C > T	Pro 146 Pro / Asn 204 Asn	T6, T14, T16, T79, T83
5	519 T > C / 611 A > G	Thr 173 Thr / Asn 204 Ser	T54
9	1008 C > T / 1047 T > C	Ala 336 Ala / His 349 His	T11, T30

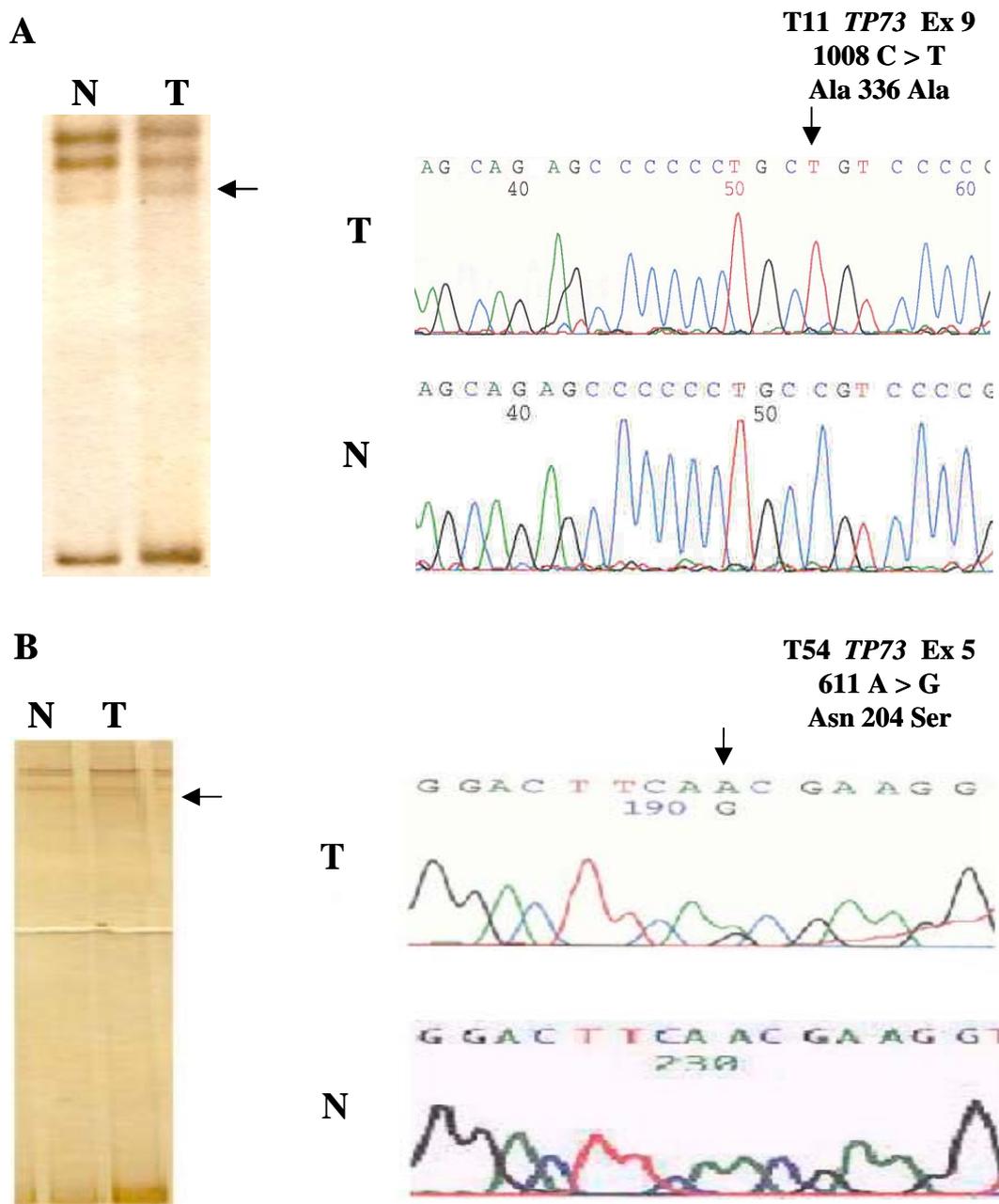


Figura 6.- (A) Mutación silenciosa en el exón 9 de *TP73* por transición C > T en la posición 1008, esta alteración se detectó en los meningiomas T11 y T30, ambos presentaron a su vez otra mutación silenciosa en la base 1047. (B) Mutación de cambio de sentido en el exón 5 de *TP73*, por transición A > G en la posición 611, este tumor (T73) presentó también una mutación silenciosa en la base 519. A la izquierda y derecha se muestran respectivamente el análisis SSCP y las secuencias sentido del ADN alterado (T) y del patrón normal (N), banda con movilidad alterada y cambio nucleotídico señalados por flechas.

4.1.2.2.- Análisis del gen *p18^{INK4c}*

En el análisis mutacional de este gen fueron estudiados los mismos 30 meningiomas mencionados más arriba y que tenían LOH en 1p, utilizando los cebadores descritos en la tabla IV. Se analizaron los dos exones de este gen que son codificantes (exones 2 y 3) presentándose los resultados en la Tabla IX.

No apareció ningún cambio de secuencia en el exón dos de *p18^{INK4c}*.

Se hallaron 2 variaciones de secuencia en el exón 3, presentándose ambas en cuatro meningiomas (13,3% del total de tumores analizados): T6, T67 y T86 de grado I y el meningioma de grado II, T83. Una de las alteraciones fue una transición T > C en la base 210 que no producía cambio de aminoácido en la cadena polipeptídica (polimorfismo), manteniéndose la Glicina 114 (Figura 7A). El otro cambio fue una inserción de tres nucleótidos (GTT) dentro del marco de lectura, inmediatamente antes de iniciarse el exón 3 pero después de la señal aceptora del mecanismo de eliminación de intrones, lo que produce la aparición de un nuevo aminoácido Valina 45 (Figura 7B). Estas variaciones de secuencia también se detectaron en las sangres de los pacientes.

Tabla IX.- Cambios de secuencia el análisis mutacional del gen *p18^{INK4c}*.

Exón / Intrón	Cambio Nucleotídico	Cambio de AA	Muestras
3	210 T > C / Ins. 3 pb <i>in frame</i> [ag 133 GTT ATGA AA]	Gly 114 Gly / Ins. Val 45	T6, T67, T83, T86

(Ins.) Inserción de nucleótido/s o de aminoácido, según sea el caso.

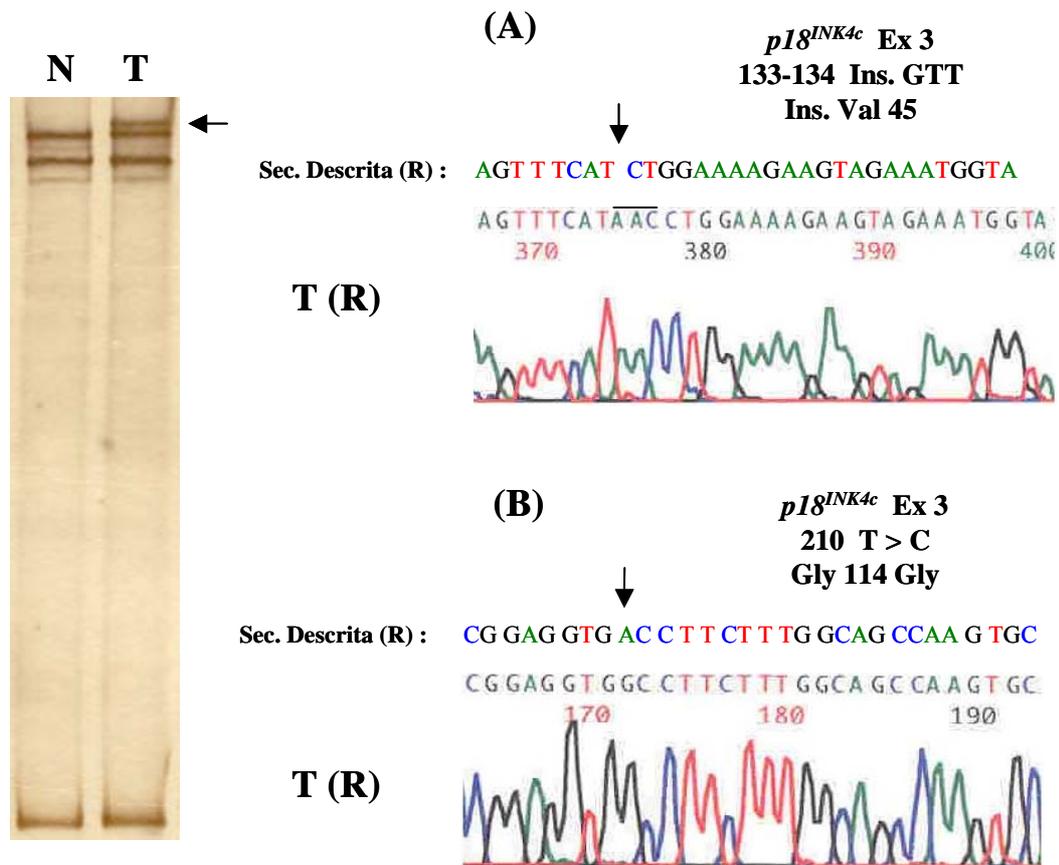


Figura 7.- A la izquierda se muestra el análisis SSCP del caso alterado (T) y del patrón normal de movilidad (N). A la derecha se muestran las secuencias antisentido (R) de los correspondientes ADN y las descritas en el GeneBank. **(A)** Mutación de inserción de 3 pb, dentro de marco, en el exón 3 de *p18^{INK4c}* que produce la aparición de un nuevo triplete, Val 45. **(B)** Mutación silenciosa en el exón 3 de *p18^{INK4c}* por transición T > C en la base 210. Ambas mutaciones se presentan en los meningiomas T6, T67, T83 y T86. La banda con movilidad alterada y el cambio nucleotídico se señalan con flechas. (Ins.) inserción.

4.2.- ANÁLISIS EPIGENÉTICO

El promotor del gen *NF2* se ha analizado en 88 de los 105 tumores en los que se realizó el análisis mutacional del gen *NF2* y de los que se disponía de suficiente ADN. Las zonas 5' flanqueantes (que incluyen el promotor y el inicio del exón 1) de los otros 9 genes estudiados (*MGMT*, *TP73*, *RB1*, *DAPK*, *ER*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*, *TIMP-3*, *THBS1*) se han analizado en 60 meningiomas: 35 de grado I, 22 de grado II y 3 de grado III según los criterios de la OMS (Kleihues y cols., 2000), incluidos en la serie completa de meningiomas estudiados. Los cebadores utilizados para la amplificación son los descritos en la Tabla V.

4.2.1.- Promotor del gen *NF2*.

El porcentaje de muestras hipermetiladas en este gen es del 53%, encontrándose un total de 47 casos con metilación alterada (Figura 8), comprobándose la hipermetilación de la muestra mediante secuenciación (Figuras 9). En la Tabla X se incluye si las muestras metiladas presentan también mutación en el gen *NF2* o pérdida de heterocigosidad en 1p y 22q, estos últimos datos obtenidos por Bello y cols. (1993, 1994 y 2000); Leone y cols. (1999) y Rey y cols. (1993) o no publicados aún.

Las frecuencias de metilación encontradas para los diferentes parámetros evaluados (LOH en 1p, LOH en 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo y edad) se presentan en la Tabla XI, desglosados por subgrupos.

De los 30 meningiomas con LOH en 1p, 12 presentan hipermetilación del gen *NF2* (40%); en los tumores sin LOH en 1p, la metilación alterada se presentó en 35 de 58 meningiomas (60%). La diferencia de proporción entre uno y otro grupo no fue significativa. Tampoco fue significativa esa diferencia entre las muestras metiladas con

LOH en 22q y aquellas que presentando metilación no tenían LOH en 22q.

Se encontraron 35 muestras hipermetiladas de 61 meningiomas de grado I, 11 de 24 meningiomas de grado II estaban hipermetilados y finalmente 1 de 3 tumores de grado III presentaron metilación alterada. Se establecieron dos grupos, uno con los de grado I y otro con los de grado II y III, debido al bajo número de meningiomas de grado III. Las proporciones obtenidas fueron de un 44% en los de grado II y III, y del 57% en los de grado I. La diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el análisis según el tipo histológico, solo los transicionales y los meningoteliales presentan un número de tumores suficiente para poder realizar el estudio estadístico. En el primer grupo el porcentaje de meningiomas en los que el promotor de *NF2* estaba hipermetilado fue del 57% (28/49) y en el segundo del 48% (10/21), no siendo significativa la diferencia de proporción encontrada entre ambos.

Tampoco fueron estadísticamente significativas las diferencias encontradas entre los dos sexos, ni en la partición realizada según la edad (≤ 50 y > 50).

Tabla X.- Resumen de la LOH 1p, LOH 22q y alteración genética y epigenética del gen *NF2*.

MUESTRA	LOH 1p (*)	LOH 22q (*)	Metilación	Cambio de secuencia
T1		+		
T2				
T3	+	+		
T4		+		+
T5	+	+		+
T6	+	+		+
T7	+	+		+
T8			+	
T9		+		+
T10				
T11	+			
T12		+		+
T13	+	+	+	+
T14	+			
T15				
T16	+			
T17	+	+	+	+
T18	+	+		+
T19	+	+	+	
T20			+	
T21			+	
T22			+	
T23	+	+		
T24	+	+	+	
T25			+	
T26			+	
T27			+	
T28				
T29			+	
T30	+	+		
T31				
T32	+		+	
T33			+	
T34			+	
T35			+	
T36		+	+	+
T37			+	
T38		+	+	+
T39		+	+	+
T40		+	+	
T41	+	+	+	
T42		+	+	+
T43				
T44			+	
T45				
T46				

Tabla X (continuación).

MUESTRA	LOH 1p (*)	LOH 22q (*)	Metilación	Cambio de secuencia
T47		+	+	
T48		+	+	
T49			+	
T50			+	
T51				
T52		+		
T53		+	+	+
T54	+		+	
T55	+	+		
T56			+	
T57		+		
T58		+		+
T59		+		
T60				
T61			+	
T62	+	+		+
T63	+	+	+	
T64			+	
T65	+			+
T66	+	+		
T67	+	+	+	
T68			+	
T69			+	
T70				
T71			+	
T72			+	
T73		+	+	+
T74				
T75		+		
T76	+	+		
T77			+	+
T78			+	
T79	+	+		
T80				
T81	+	+	+	
T82	+	+		
T83	+	+	+	+
T84		+	+	
T85				
T86	+		+	
T87		+		
T88	+	+		

(+) → Pérdida de heterocigosidad, muestra metilada, o muestra mutada según corresponda.

(*) → Datos obtenidos por Bello y cols. (1993, 1994 y 2000); Leone y cols. (1999) y Rey y cols. (1993) o no publicados.

Tabla XI.- Porcentajes de metilación en los 88 meningiomas estudiados para el gen *NF2*, por parámetros analizados.

Factor	LOH 1p		LOH 22q		Grado de Malignidad			Tipo Histológico (*)					SEXO (+)		EDAD	
	con	sin	con	sin	I	II	III	T	M	F	PS	FUS	♂	♀	≤50	> 50
Metilados	12	35	19	23	35	11	1	33	10	2	2	0	17	30	17	30
Total	30	58	43	37	61	24	3	58	21	4	4	1	26	62	30	58
Frecuencia	40%	60%	44%	62%	57%	46%	33%	57%	48%	50%	50%	0%	65%	48%	57%	52%

(*) → (T) Transicional, (M) Meningotelial, (F) Fibromatoso, (Ps) Psammomatoso, (fus) Fusiforme.

(+) → Mujer (♀), Varón (♂).

4.2.2.- Patrón de Metilación.

En los 60 meningiomas utilizados para este análisis, se investigó el estado de metilación de 9 genes relacionados con el fenómeno tumoral y se han incluido aquí los resultados de metilación del gen *NF2* para estos 60 tumores. Se presenta en la Tabla XII los resultados obtenidos por gen así como la frecuencia de metilación para cada uno de ellos y el Índice de Metilación (IM).

En las figuras 8 y 9 se muestran los geles de agarosa y las secuencias de meningiomas hipermetilados. En ellas se comprueba la presencia de muestras hipermetiladas y se observan las islas CpG metiladas, que conservan las Citosinas.

Se encuentra hipermetilación en las islas CpG de todos los genes estudiados, pudiéndose agrupar estos genes según la proporción de tumores con islas CpG hipermetiladas (Tabla XIII). Un primer grupo estaría formado por los genes con valores más altos de metilación ($\geq 40\%$), en los que se incluirían *NF2* y *TIMP-3*, con valores del 47% y del 43% respectivamente. Un segundo grupo lo formarían los genes con valores intermedios ($< 40\%$ y $\geq 20\%$), en el que se pueden incluir *THBS1*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*, *TP73* así como *MGMT* con valores de 32%, 27%, 23%, 23% y 22% respectivamente. El tercer grupo es el de genes con valores bajos de metilación ($\leq 20\%$), donde se incluyen *ER*, *DAPK* y *RBI* cuyos porcentajes son respectivamente 18%, 17% y 13%.

Si se compararan los porcentajes de alteración del patrón de metilación entre los dos grupos definidos en relación a la pérdida o no de heterocigosidad (LOH) en 1p, solo se encontraron diferencias significativas al 95% ($p < 0,05$) en los genes *TP73*, *DAPK* y *THBS1*. En el primero y último de estos genes las diferencias son a favor del grupo que presenta LOH en 1p, mientras que en *DAPK* el porcentaje significativamente mayor es el de los meningiomas sin LOH en 1p (Tabla XIII).

Para ninguno de los genes estudiados se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas en el grado de metilación al analizarlos en relación a la LOH en 22q.

Si nos fijamos en las diferencias de patrón de metilación entre los distintos grupos de meningiomas, según su grado de malignidad y tipo histológico, podemos observar que la diferencia en los porcentajes de metilación entre estos grupos no son significativas para ningún gen (Tabla XIII). Se debe señalar que en los tipos Fibromatoso, Psammomatoso y Fusiforme el número de meningiomas que los componen es muy pequeño, 3, 3 y 1 respectivamente, con lo que no se ha valorado si las diferencias entre porcentajes son o no significativas.

Si se analiza el parámetro sexo, solo hay diferencias significativas entre ambos sexos en el gen *p16^{INK4a}* ($p < 0,05$), apareciendo más hipermetilado este gen en los meningiomas pertenecientes a pacientes de sexo femenino (Tabla XIII). Al comparar los dos grupos establecidos en relación a la edad (mayores o menores de 50 años) no se encontraron diferencias significativas en ningún gen.

Una medida más detallada del estado general de metilación nos la ofrece el IM obtenido por tumor (Tabla XII) siendo con éste con el que se calculó el IM medio total. En nuestra serie de meningiomas el valor de este índice para los 10 genes analizados fue de 0,265. El IM para cada parámetro valorado (LOH en 1p y 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo y edad) se presenta en la Tabla XIII.

Si se analizan por separado los parámetros estudiados en la serie solo se encuentran diferencias significativas al 95% ($p < 0,05$) en la edad. En el grupo de meningiomas ≤ 50 años se obtuvo un IM medio de 0,22 y en el grupo de mayores de 50 años el valor fue de 0,30.

Tabla XII.- Resultados de metilación en los 10 genes estudiados.

MUESTRAS	MGMT	TP73	RB1	DAPK	ER	p16 (INK4a)	p14 (ARF)	TIMP-3	THBS1	NF2	IM
T1						•					0,1
T2											0
T3					•			•			0,2
T4	•		•		•		•				0,4
T5		•				•		•			0,3
T6		•						•	•		0,3
T7					•	•					0,2
T8	•				•		•			•	0,4
T9	•	•						•			0,3
T10										•	0,1
T11		•			•			•			0,3
T12			•				•	•			0,3
T13		•				•				•	0,3
T14						•	•	•	•		0,4
T15			•				•				0,2
T16		•					•	•	•		0,4
T17	•						•	•		•	0,4
T18		•				•		•			0,3
T19									•	•	0,2
T20				•						•	0,2
T21		•								•	0,2
T23	•		•	•		•		•	•		0,6
T24										•	0,1
T25							•	•		•	0,3
T26	•			•		•					0,3
T27				•		•		•			0,3
T28				•							0,1
T29								•			0,1
T30	•				•			•			0,3
T31				•				•			0,2
T32			•		•				•	•	0,4
T33	•									•	0,2
T34						•		•		•	0,3
T36										•	0,1
T37				•		•				•	0,3
T38				•	•					•	0,3
T39				•				•		•	0,3
T40									•	•	0,2
T41			•						•	•	0,3
T43				•			•	•			0,3
T48	•							•		•	0,3
T54					•					•	0,2
T55	•	•	•				•		•		0,5
T62								•	•		0,2
T63	•							•	•	•	0,4
T64	•					•			•	•	0,4
T65									•		0,1
T66											0
T67	•	•				•	•			•	0,5
T73					•					•	0,2
T74		•				•	•		•		0,4
T76					•				•		0,2
T79		•									0,1
T81			•			•	•			•	0,4
T82									•		0,1
T83								•	•	•	0,3
T84		•				•			•	•	0,4
T86		•					•	•		•	0,4
T87								•			0,1
T88								•	•		0,2
	13/60	14/60	8/60	10/60	11/60	16/60	14/60	26/60	19/60	28/60	
%	22%	23%	13%	17%	18%	27%	23%	43%	32%	47%	
IM total											0,265

(*) Muestra metilada. (IM) Índice de Metilación.

Tabla XIII.- Frecuencias de metilación para los 10 genes analizados por parámetro estudiado.

Factor GEN	TOTALES	LOH 1p (#)		LOH 22q (#)		Grado de Malignidad			Tipo Histológico (*)					SEXO (+)		EDAD	
		con	sin	con	sin	I	II	III	T(32)	M(17)	F(3)	PS(3)	FUS(1)	♂	♀	≤ 50	> 50
MGMT																	
Frec.	22%	20%	23%	26%	16%	23%	23%	0%	25%	18%	33%	0%	0%	13%	26%	16%	25%
TP73																	
Frec.	23%	33%	13%	26%	20%	20%	23%	33%	22%	24%	33%	0%	100%	19%	26%	26%	23%
RBI																	
Frec.	13%	17%	10%	17%	6%	14%	14%	0%	13%	18%	33%	0%	0%	6%	14%	5%	15%
DAPK																	
Frec.	17%	3%	30%	9%	28%	23%	9%	0%	22%	6%	67%	0%	0%	13%	19%	11%	20%
ER																	
Frec.	18%	23%	13%	20%	16%	14%	23%	33%	16%	24%	67%	0%	0%	25%	16%	5%	25%
p16^{INK4a}																	
Frec.	27%	27%	27%	26%	28%	26%	23%	67%	25%	29%	33%	33%	0%	6%	35%	21%	30%
p14^{ARF}																	
Frec.	23%	23%	23%	17%	32%	29%	18%	0%	25%	24%	0%	33%	0%	19%	23%	11%	28%
TIMP-3																	
Frec.	43%	50%	37%	46%	40%	37%	55%	33%	31%	53%	67%	100%	0%	44%	44%	325	50%
THBS1																	
Frec.	32%	50%	13%	37%	24%	26%	41%	33%	34%	24%	33%	67%	0%	38%	30%	26%	35%
NF2																	
Frec.	47%	40%	53%	46%	48%	49%	45%	33%	56%	35%	33%	33%	0%	63%	42%	53%	45%
índice de Metilación	0,265	0,293	0,243	0,269	0,260	0,263	0,273	0,233	0,269	0,253	0,4	0,267	0	0,244	0,274	0,218	0,295

(#) → (con) Con pérdida de heterocigosidad; (sin) sin pérdida de heterocigosidad.

(*) → (T) Transicional, (M) Meningotelial, (F) Fibromatoso, (Ps) Psammomatoso, (fus) Fusiforme.

(+) → (♀) Hembra, (♂) Varón.

En **negrita** los valores en los que la diferencia entre grupos es significativa al 95% (P<0,05).

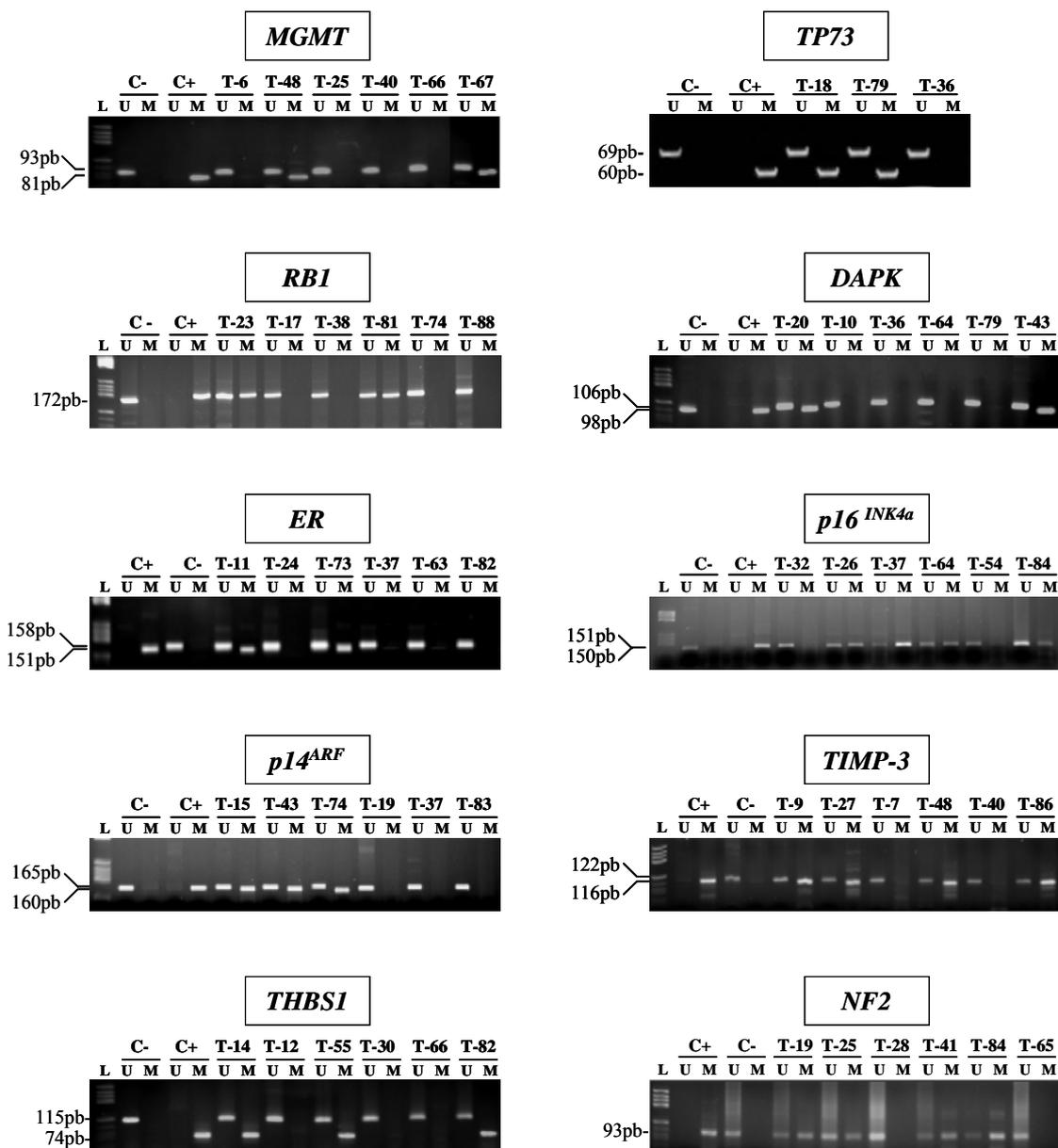


Figura 8.- Análisis de Metilación en los 10 genes estudiados por MSP. El gen se señala recuadrado, arriba de cada gel de agarosa. (C-) ADN de tejido normal de meninge utilizado como control negativo; (C+) ADN metilado *in vitro* procedente de sangre periférica que se utilizó como control positivo de metilación. Línea L, escala de tamaños; línea U, producto amplificado con cebadores no metilados específicos; línea M, producto amplificado con cebadores metilados específicos. Los tamaños de los productos amplificados de todos los genes se muestran a la izquierda de cada gel.

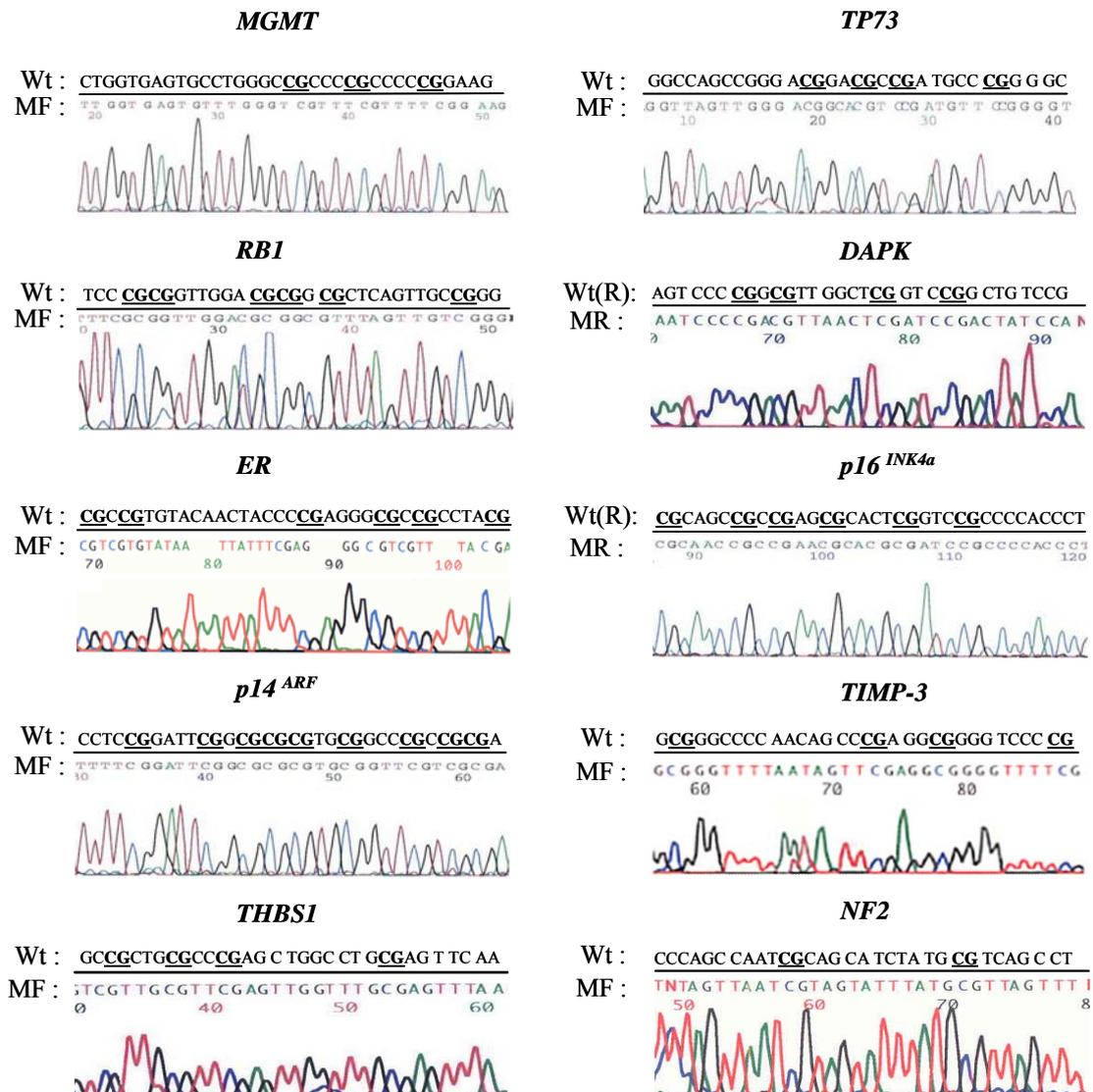


Figura 9.- Demostración de la hipermetilación en las islas CpG de los 10 genes estudiados. Se presenta la secuencia sentido (F) o antisentido (R) de la muestra modificada con bisulfito y amplificada con los cebadores metilados, donde se observa que las C metiladas se conservan (G en la secuencia antisentido). También se incluye la secuencia no modificada (Wt) donde se han señalado en subrayado y con negrita las islas CpG que se metilan. Todas las secuencias están descritas en el sentido 5' → 3'.

5.- DISCUSIÓN

En 22q se encuentran localizados, el gen *NF2* cuya inactivación esta establecida como un acontecimiento temprano en la génesis de meningiomas y schwannomas (Rouleau y cols., 1993; Trofatter y cols., 1993) y también el gen *INI1^{hSNF5}* asociado por algunos investigadores a la génesis de meningiomas (Schmitz y cols., 2001).

En 1p se localizan regiones asociadas a progresión en meningiomas como ya han señalado Lindblom y cols. (1994), Bello y cols. (1995), Simon y cols. (1995), Menon y cols. (1997), Tse y cols. (1997), Leone y cols. (1999), Joachim y cols. (2001), Bello y cols. (2000), Murakami y cols. (2003) entre otros, es en ellas donde se encuentran localizados los posibles oncosupresores *p18^{INK4c}* y *TP73*.

Además del análisis mutacional, que puede explicar el origen y progresión de un subgrupo de los meningiomas analizados, se han estudiado otros mecanismos de inactivación de genes relacionados con el fenómeno tumoral, en concreto la hipermetilación de las islas CpG del extremo 5' (regulador) generalmente asociada a la inactivación de los GST (Jones 1996; Baylin y cols., 1998). Con este análisis se intenta dar una explicación, dentro de la hipótesis de inactivación de GST de Knudson Jr. (1971) y Knudson, (1993), de una fracción importante de meningiomas sin mutación en alguno de los genes identificados como relevantes para la oncogénesis y la progresión de este tipo tumoral.

5.1.- ANÁLISIS MUTACIONAL

5.1.1.- Genes localizados en 22q

5.1.1.1- Análisis del gen NF2

El porcentaje de mutaciones encontrado en nuestra serie de meningiomas fue del 24%, un valor incluido dentro del intervalo de frecuencias encontrado en otros estudios

realizados utilizando la metodología PCR-SSCP. Así, tanto Ng y cols. (1995) con un 27%, Harada y cols. (1996) con un 30%, como Ueki y cols. (1999) con un 20% obtienen valores cercanos a los nuestros en meningiomas esporádicos.

En nuestra serie tumoral la distribución de las alteraciones del gen *NF2* fue como sigue:

- Mutaciones sin sentido producidas por pequeñas deleciones 40%.
 - Mutaciones que producen un codón stop debido a sustituciones 40%.
- Ambas producen una proteína truncada.
- Mutaciones en la zona intrónica 8%.
 - Mutaciones de cambio de sentido 4%.
 - Mutaciones por deleción dentro de marco 4%.
 - Polimorfismos 4%.

Esta clasificación es parecida tanto a la reseñada en la revisión de MacCollin (1996) como a las obtenidas posteriormente por De Vitis y cols.(1996b), Ueki y cols. (1999) y Joachim y cols. (2001). Como todos ellos señalan son las mutaciones que producen proteínas truncadas las más frecuentes, siendo las mutaciones de cambio de sentido muy poco frecuentes.

La asociación entre el tipo histológico de meningioma y el patrón genético tumoral ha sido postulada por algunos autores, Wellenreuther y cols. (1995) y Kros y cols. (2001). Ellos encuentran mayor frecuencia de mutaciones del gen *NF2* en tumores con histología fibromatosa o transicional, 70 y 80% respectivamente, que en el tipo meningotelial que las presenta en un 25% según estos investigadores.

Los porcentajes en nuestra investigación, para los tipos histológicos fibromatoso

y transicional, fueron del 40 y el 14 %, mientras que el porcentaje de meningiomas de histología meningotelial con mutación fue del 48%. En el trabajo publicado por Ueki y cols. (1999) se obtienen para los tipos fibromatoso y transicional unos porcentajes del 36 y el 13%, similares a los obtenidos en nuestro estudio.

Todas estas discrepancias en los resultados quizás puedan explicarse por la composición de la serie utilizada en nuestro estudio. Al comparar los porcentajes de cada subtipo histológico en la bibliografía (Papi y cols., 1995; Wellenreuther y cols., 1995; Ng y cols., 1995; Ueki y cols., 1999; Evans y cols., 2001) se observa que las proporciones de cada uno de ellos en esas series son parecidas entre sí, mientras que en la serie utilizada en nuestro estudio el tipo transicional está más altamente representado. También en nuestra serie es significativamente más alto el porcentaje de meningiomas meningoteliales de grado II y III, 15 de 21, que el porcentaje de este mismo tipo en otros trabajos revisados: en los estudios de Wellenreuther y cols. (1995), Ueki y cols. (1999) y Evans y cols. (2001) todos los meningiomas meningoteliales son de grado I y en el de Kros y cols., (2001) solo 1 de 18 era de grado II. Ambas diferencias podrían haber producido un sesgo hacia arriba en los resultados porcentuales obtenidos para este subtipo en nuestra serie.

De los 21 meningiomas con mutación en el gen *NF2* de los que se tenían datos de LOH en 22q, 18 presentaban pérdida (86%) en el brazo largo del cromosoma 22. Los meningiomas T44 y T77, de grado I y de tipo transicional y psammomatoso respectivamente, presentan mutación en el gen *NF2* y no tienen LOH en 22q. Estas mutaciones están producidas por deleciones en la secuencia nucleotídica que cambian el marco de lectura y producen proteínas truncadas. En ambos casos la inactivación del gen vendría dada por la hipermetilación de las islas CpG del promotor del gen *NF2* en

uno de los alelos y la mutación en el gen *NF2* del otro alelo. De esta manera se cumpliría la hipótesis de Knudson (1971 y 1993) que explica la actuación recesiva de las mutaciones en los oncosupresores.

No se explicaría así el caso T65, grado II, que presentando una mutación en el exón tres no presentó ni LOH en 22q ni hipermetilación en el promotor de *NF2*. Esta mutación produce la pérdida de la Phe 119. Se ha descrito que la pérdida del aminoácido Phe 118 estaría asociada a la forma severa del síndrome NF2, debido a la localización de este aminoácido en el “core” hidrofóbico del dominio ERM de merlin. Su pérdida produciría la desorganización de este “core”, teniendo consecuencias en la difusión, por el citoplasma, de la proteína y un incremento de su tendencia a separarse de la superficie plasmática (Stokowski y Cox , 2000; Brault y cols., 2001). Por todo esto no es arriesgado proponer la misma explicación para el efecto tumorigénico de la pérdida del aminoácido Phe 119. Faltaría por conocer cual es el otro suceso que acompañaría a esta mutación para que se cumpliera la hipótesis de Knudson, quizás intervengan microdeleciones no encontradas en el estudio de LOH en 22q del alelo no mutado u otros mecanismos de inactivación del gen *NF2* no descritos hasta ahora.

En los meningiomas T5, T17, T36 y T83, tres de ellos de grado II, se encontraron mutaciones, en el gen *NF2*, de cambio de marco de lectura debido a deleciones nucleotídicas diversas. Éstas producían truncamiento de la proteína lo que podría justificar la agresividad de la mayoría de ellas. Además en el meningioma T83, grado II, también se encuentra mutado el gen *p18^{INK4c}* lo que reforzaría la idea de que la acumulación de mutaciones es fundamental para la progresión de tumores a formas más agresivas (Simon y cols., 1995; Weber y cols., 1997; Leone y cols., 1999).

Se localizaron tres deleciones más y una inserción, que truncaban la proteína en

el dominio α -hélice, en los meningiomas T38, T53 y T138 las deleciones y en el T125 la inserción, todos de grado I. Ninguna de ellas habían sido descritas anteriormente.

En nuestra serie aparecieron 3 meningiomas con una transición $C > T$ en el codón 57 (CGA) que produce un codón stop y trunca la proteína. Esta mutación ya fue descrita por Rouleau y cols. (1993) y se ha encontrado, tanto en meningiomas como en neurinomas, en diversas series (Papi y cols., 1995; De Vitis y cols., 1996b; Joachim y cols., 2001; Sainz y cols., 1994; Jacoby y cols., 1994 y 1996; Mérel y cols., 1995). De los tres meningiomas: T18 es un meningioma de grado III y que presenta pérdida de heterocigosidad en 1p, 14q y 22q con lo que su perfil de tumor agresivo se confirmaba totalmente; T38 un caso de grado I pero con pérdida también en el cromosoma 14 además de otra mutación de cambio de marco en el exón 13 de *NF2*, lo que podría estar indicando el estado previo a adquirir agresividad y por último el T58, una neoplasia meningotelial de grado I, que pertenecía a una mujer de 19 años lo que podría hacer pensar en una evolución a forma más agresiva. El aminoácido codificado, Arginina 57, parece estar relacionado por su posición con la estabilidad de la estructura funcional de merlin, debido a su unión por enlace de hidrógeno a dos residuos del dominio α -hélice, Glu317 y Gln324 (Shimizu y cols., 2002). Este enlace ayuda a mantener la estabilidad de un surco formado entre el subdominio A y el subdominio C del dominio ERM. Es en esta zona donde se une merlin a PIP₂ un glucolípido de la cara interna de la membrana citoplásmica (Gautreau y cols., 2002; Shimizu y cols., 2002; Kressel y Schmucker., 2002). La molécula PIP₂ interviene en la activación por fosforilación de merlin, manteniendo su localización en la membrana e impidiendo su introducción en el núcleo.

Se ha encontrado también una transición $C > T$ en el codón 341 (CGA) en dos tumores de nuestra serie (T6 y T7) de grado I y II respectivamente. El primero presenta

pérdida de heterocigosidad en 22q y el segundo pérdida de 1p, 14q y 22q. Las diferencias en cuanto al grado de desdiferenciación pueden ser explicadas si tenemos en cuenta las diversas pérdidas de heterocigosidad del segundo caso, lo que apoyaría la existencia de un mecanismo de múltiples etapas (Simon y cols., 1995; Weber y cols., 1997; Leone y cols., 1999) como forma de adquisición de agresividad por parte de aquellos tumores en los que se acumularían pérdidas y alteraciones en otros cromosomas, además del 22.

Otra sustitución por transición C > T en el codón 324 (CAG), se localizó en nuestra serie en el tumor T143 de grado II, ésta producía un codón de parada y por tanto el truncamiento de merlin. Para explicar la agresividad que presenta este tumor no disponemos de datos de LOH, en este momento, que podrían aportar información sobre regiones alteradas en 22q u otras localizaciones relacionadas con la tumorigénesis en meningiomas. Esta misma alteración ha sido también descrita por Mohyuddin y cols. (2002) en un schwannoma asociado a un paciente con síndrome NF2 y con LOH en la región del gen *NF2*.

Se identificaron también transiciones C > T en los codones 337, 362 y 400, todos ellos tripletes CAG, de tres meningiomas (grado I) T9, T12 y T42 respectivamente y con LOH en 22q. Ninguno de estos tumores tienen pérdida en 1p pero el meningioma T42 presenta hipermetilación en el promotor del gen *NF2*. La primera mutación fue descrita por Wellenreuther y cols. (1995) en un meningioma esporádico atípico, y la segunda lo fue por Jacoby y cols. (1996) en un schwannoma vestibular también esporádico, mientras que la transición en el codón 400 ha sido descrita por Parry y cols. (1996) en un paciente NF2 con grado de afectación severo. No es clara para estas mutaciones concretas la asociación entre la mutación localizada y la

agresividad del tumor.

Por último se identificó otra transición C > T en el codón 456 (CAG) del meningioma (T13) de grado II y que presenta pérdidas en 1p y 22q. Esta mutación produce un codón stop que trunca la proteína, abundando en la idea de la progresión tumoral explicada mediante la acumulación de alteraciones. Esta sustitución fue descrita en un schwannoma vestibular de un paciente con NF2 y grado de afectación severo por Kluwe y cols. (1996), y por Joachim y cols. (2001) en un meningioma esporádico de grado III.

Es destacable la alta frecuencia de transiciones C > T encontradas en codones CGA y CAG en nuestra serie, 10 de 25 (40% de los meningiomas con alteración). La posible explicación se encontraría en el hecho de que estos tripletes contienen una metilcitosina que espontáneamente sufre deaminación, reemplazándose el grupo amino por el grupo cetona, que convierte la 5-metilcitosina en timina (Coulondre y cols., 1978). Basándose en el hallazgo de mutaciones en 4 codones CGA, Sainz y cols. (1995) plantearon que este tipo de codones constituirían "puntos calientes" en el gen *NF2*. En la revisión de MacCollin (MacCollin, 1996) aparecen descritas mutaciones en 16 de los 27 codones CAG existentes en el gen, lo cual apuntaría la posibilidad de que estos fueran también "puntos calientes" de acumulación de mutaciones. Los resultados presentados en este trabajo corroborarían esta hipótesis.

El meningioma atípico T62, con LOH en 1p, 14q y 22q, presentó un cambio C > G en el codón 481 que producía un codón stop que trunca la proteína a mitad del dominio α -hélice, teniendo un claro perfil de agresividad debido a esa acumulación de pérdidas en cromosomas relacionados con génesis tumoral y progresión. Esta alteración del gen *NF2* fue descrita previamente en un schwannoma espinal de un paciente NF2 por

Koga y cols. (1998).

El dominio α -hélice de merlin, situado entre los codones 312 y 505, tiene como función conectar los dominios N y C-terminal ayudando a regular la actividad de la proteína (Shimizu y cols., 2002). Se ha demostrado, por estudios de la estructura secundaria en otras proteínas de la familia ERM (radixina, moesina), que el dominio α -hélice tiene, en la proteína en estado inactivo, una estructura característica (Hamada y cols., 2000; Pearson y cols., 2000; Edwards y Keep, 2001). Este dominio formaría un ángulo que permite la asociación intramolecular entre los extremos de estas proteínas y el mantenimiento de ese estado inactivo (Edwards y Keep, 2001), gracias en parte a que el dominio C-terminal bloquearía la zona de unión a PIP₂, molécula implicada en la activación de esta familia de proteínas (Hamada y cols., 2000; Pearson y cols., 2000). Las mutaciones que encontramos en esta zona, exones 10 a 14, producían todas una proteína truncada. Este es el dominio más frecuentemente alterado en nuestra serie (13 de 25 muestras) a pesar de no ser el de mayor tamaño. La explicación de este hecho podría encontrarse en su elevada proporción de codones CAG y CGA, que como se ha visto anteriormente son posibles puntos calientes del gen *NF2*.

Las mutaciones que producen proteína truncada en el gen *NF2* son las más frecuentes en nuestra serie, 80% del total de casos mutados. Existiendo 11 con signos de agresividad entre los 18 tumores (61%) en los que con este tipo de alteración disponíamos de datos de LOH. Esta frecuencia podría apuntar hacia una cierta asociación entre este tipo de mutación en el gen *NF2* y una mayor agresividad de esta neoplasia, tanto de nuestros datos como también de los resultados de otros grupos (Wellenreuther y cols., 1995; Stokowski y Cox, 2000; Joachim y cols., 2001; Brault y cols., 2001; Gautreau y cols., 2002; Shimizu y cols., 2002; Kressel y Schmucker., 2002).

Otro tipo de mutación encontrada en nuestra serie es la relacionada con el mecanismo de splicing. En el meningioma T136 (recidiva de grado I) se localizó una transición $G > A$ en el sitio donador del intrón 7 (7/+1). Una transversión $G > C$ en el sitio donador del intrón 13 (13/+1) se localizó en la muestra T39, un meningioma meningotelial de grado II. Este último posee, además de esta mutación, pérdida de 22q y 14q. La pérdida de funcionalidad en genes localizados en el cromosoma 14 podría explicar la agresividad de este meningioma. Este tipo de mutaciones se presentan en los pacientes NF2 con diferente grado de afectación, o con grado de agresividad variable en los esporádicos. Ésto se debe a los diferentes ARN mensajeros que se pueden producir por la alteración del mecanismo de corte y unión de los exones (Kluwe y cols., 1996; Kluwe y cols., 1998). Estas alteraciones pueden tener en general dos tipos de consecuencias fenotípicas (Goutebroze y cols., 2000):

- Producir, por terminación prematura de la traducción, una proteína truncada.
- O bien una proteína aberrante y no funcional, por la supresión del exón correspondiente sin que cambie el marco de lectura.

La única mutación de cambio de sentido que se encontró en esta serie fue una transversión $C > A$ que producía un cambio de aminoácido (Ala 211 Asp) en la proteína del caso T73 (grado I). A nivel molecular, la sustitución de un aminoácido neutral e hidrofóbico (Ala) por otro ácido (Asp) produciría una modificación de la estructura secundaria del dominio proteico (ERM) que se encarga de unir merlin con proteínas de membrana como CD44 y otras (Sainio y cols., 1997). Más concretamente Shimizu y cols. (2002) señalan que esta Ala 211 forma parte de uno de los 3 subdominios ($\alpha 4B$) del dominio ERM, por lo que al producirse la mutación a un resto ácido (Asp) se estaría desestabilizando, al menos en cuanto a la carga, esa zona de la proteína. Al producir una

proteína de tamaño normal, aunque alterada, el grado de malignidad que presentan los meningiomas que tiene este tipo de mutación suele ser grado I, dependiendo eso sí de la importancia funcional de la región en que se produce (Bourn y cols., 1994; Scoles y cols., 1996).

Analizada la secuencia del gen *NF2* se ha encontrado un porcentaje de mutación (24%) parecido al encontrado en otras series de meningiomas esporádicos. La distribución de los tipos de alteraciones encontradas en nuestra serie no se aleja del que encuentran otros investigadores, con una alta frecuencia de transiciones C > T en codones CGA y CAG lo que los señalaría como posibles “puntos calientes”.

5.1.1.2.- Análisis del gen *INI1*

El gen *INI1*^{*hSNF5*}, está localizado en 22q11.23. Este gen fue aislado por clonaje posicional (Kalpana y cols., 1994) y se ha demostrado que es un potente regulador de la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular, lo cual refuerza su papel como oncosupresor (Versteeg y cols., 1998 y 2002). Se han descrito algunos polimorfismos y mutaciones de cambio de sentido en el exón nueve de *INI1*^{*hSNF5*} en una serie de 126 meningiomas (Schmitz y cols., 2001), por lo que su importancia en la génesis de este tipo de tumores está siendo investigada.

El primer dato reseñable del análisis mutacional en el gen *INI1*^{*hSNF5*} es la aparente discrepancia observada al comparar algunas de las secuencias obtenidas en nuestro estudio con las disponibles en el GeneBank (números de acceso: U64847 e Y17118 a Y17126). La primera diferencia se localizaría en el nucleótido 408, recogida como timina pero que en los meningiomas de nuestra serie, en los controles de cerebro no tumoral y sangres secuenciados era una citosina. El correspondiente codón, 136, codificaría para una Prolina en lugar de la Serina predicha.

Otra diferencia se encontró en el codón 378, descrito como CTT pero que en las muestras tumorales y normales de nuestra serie aparecía como GAA, siendo por tanto el aminoácido correcto una Leucina y no Ácido Glutámico.

Por último, encontramos otra diferencia en el nucleótido 1152, recogida como una guanina mientras que la base que aparecía en las muestras de nuestra serie era una citosina, lo que cambiaba la codificación del codón 382 que pasaba a ser una Alanina en lugar de la Glicina presente en la secuencia del GeneBank.

Nuestros datos estarían corroborando los obtenidos por Biegel y cols. (1999) en un análisis de *INII^{hSNF5}* en tumores teratoides atípicos y rhabdoides (AT/RT) de cerebro y tumores rhabdoides renales y extrarenales que encuentran las mismas variaciones respecto a la secuencia descrita en el GeneBank.

Otra diferencia con esta base de datos, encontrada pero no señalada previamente en la bibliografía, es la alteración que se localizó, en la totalidad de las muestras de este estudio, en la posición (1/+119) del intrón 1. Ésta consistió en una delección de dos bases (GC), en una zona con cinco pares de GC, que producía una secuencia doble. Quizás se trate de un polimorfismo de secuencia, siendo conveniente la realización de un estudio en sangre de población general para definir el porcentaje de cada variante.

El tipo de alteración más frecuentemente encontrado en el gen *INII^{hSNF5}* fue el localizado en los intrones, que producía una distorsión en el mecanismo de corte de intrones y unión de exones. Los intrones afectados por estas alteraciones en nuestro estudio fueron el 1, 2, 7 y 8. Esta frecuencia relativamente alta de alteraciones localizadas en los fragmentos intrónicos de la secuencia del gen *INII^{hSNF5}* se ha encontrado también en estudios como el de Grand y cols. (1999) en leucemias mieloides crónicas, el de Yuge y cols. (2000) en linfomas malignos y también en el de Schmitz y

cols. (2001) en meningiomas. Una menor frecuencia de alteraciones intrónicas a la encontrada por nosotros aparece también en la bibliografía, asociada casi siempre a estudios en tumores rhabdoides malignos (Sévenet y cols., 1999a y 1999b; Biegel y cols., 1999; Versteeg y cols., 1998). En nuestro estudio, las mutaciones de splicing encontradas lo eran mayoritariamente en meningiomas de grado I. Una posible excepción sería la alteración encontrada en el intrón 7 (7/+58) identificada en el 82% de nuestra serie. Quizás también es reseñable el meningioma T32 de grado I, donde se localizó una mutación de splicing en el intrón 2 (3/-9). Este último caso presentaba también LOH en 1p, un conocido indicador de progresión en este tipo de tumores. En el otro tumor con alteración en este mecanismo (caso T29) no había datos que la asociaran a progresión tumoral.

La alteración encontrada en el intrón 8 (9/-41) se identificó en 7 meningiomas todos ellos de grado I. Los resultados obtenidos por Grand y cols. (1999) indicaban que esta alteración era una variante polimórfica no asociada al proceso tumoral.

Este tipo de mutaciones se presentan, como se observa, en tumores con grados de malignidad diferentes, debido a los diversos ARN mensajeros que se producen por la alteración del mecanismo de corte y unión de los exones. En la investigación llevada a cabo por Schmitz y cols. (2001) se analizaron las frecuencias de las variantes polimórficas intrónicas encontradas por ellos, tanto en controles como en tumores, siendo la incidencia la misma en ambos, lo que les sugirió que estas variantes intrónicas no tendrían una significación patogénica relevante en la génesis de los meningiomas. Sería conveniente un examen de las frecuencias de las variantes intrónicas encontradas en nuestro estudio, y no descritas previamente, en población control para corroborar o refutar esta hipótesis. Otro polimorfismo, también identificado en nuestro estudio y con

una frecuencia del 88%, se localizó en la posición 902 (exón 7) y no cambiaba el aminoácido codificado por el codón 299, una Serina. Este polimorfismo fue descrito por Grand y cols. (1999), Manda y cols. (2000) y Yuge y cols. (2000) y produce la aparición de una diana de reconocimiento para la enzima de restricción DdeI. También fue localizado por Schmitz y col. (2001) en una serie de meningiomas, y en los controles sanos testados la frecuencia que presentó era superior, significativamente, a la encontrada en su serie tumoral.

En nuestro estudio se identificaron 3 mutaciones distintas de cambio de sentido en el gen *INI1^{hSNF5}*, todas ellas en el exón 9 y situadas en el dominio SNF5, localizado en posición C-terminal de la proteína ini1 (Versteeg y cols., 1998). Este dominio está altamente conservado en la evolución por su papel destacado en la actividad remodeladora de cromatina que al menos *in vitro* realiza ini1 (Biegel y cols., 2002).

La primera mutación de cambio de sentido se encontró en el tumor T45 (grado II), sin mutación ni patrón alterado de metilación en *NF2*, ni LOH en 22q. Esta alteración se localizó en el codón 374 y se debía a una transición G > A que cambiaba la Arginina codificada por una Glutamina. Esta alteración fue descrita por Yuge y cols. (2000) en un estudio en linfomas malignos, en un caso que presentaba también una mutación sin sentido en el codón 368 sugiriendo que cada alelo presentaría una mutación lo que cumpliría el modelo de inactivación de GST de Knudson (1971, 1993). En nuestro caso faltaría por averiguar cuál es ese segundo suceso que produciría la inactivación del gen *INI1^{hSNF5}* y contribuiría a la génesis y progresión de este meningioma. El meningioma T45 es del tipo histológico meningotelial, en el cual se ha postulado la existencia de un patrón de génesis tumoral distinto al de los otros dos tipos histológicos (fibromatoso y transicional) debido a la baja frecuencia de mutaciones en el

gen *NF2* (Evans y cols., 2001). Según estos autores el desarrollo de este tipo de meningiomas se debería a:

- Alteraciones en genes con efectos fenotípicos similares a los producidos por la inactivación del gen *NF2*.
- Alteraciones en proteínas que interactúan funcionalmente con merlin o que tienen una función “corriente a bajo” de la de merlin.

La génesis y progresión del meningioma meningotelial T45 podría explicarse por un mecanismo alternativo al clásico (inactivación del gen *NF2* y acumulación de alteraciones en otros oncosupresores asociados a meningiomas) que consistiría en la inactivación del gen *INI1^{hSNF5}* y posterior acumulación de otras alteraciones en genes no identificados en los cromosomas asociados a progresión de meningiomas.

Se localizó también un cambio de sentido en el codón 377 de la muestra T29 (grado I). Este tumor presentaba LOH en 22q, ausencia de mutación en *NF2* pero sí tenía hipermetilación en el promotor de este gen. El cambio fue una transición C > T que cambiaba la Arginina codificada por una Cisteína. Se ha descrito la formación de un puente disulfuro entre dos Cisteínas en los codones 223 y 298 del gen *INI1^{hSNF5}* (Bruder y cols., 1999); no es por tanto arriesgado suponer que la aparición de una Cisteína en la posición 377 podría inducir la formación de otro puente disulfuro con la Cisteína 350, alterando así la configuración tridimensional de este subdominio (espiral enrollada). Esta zona está envuelta en interacciones proteína-proteína, bien con otros componentes del complejo SWI/SNF o con proteínas intermediadoras en su función como activador transcripcional de genes inducibles.

El otro cambio de sentido también localizado en el codón 377, se debió a la sustitución de la segunda base de este triplete, G > A, lo que produce el cambio de una

Arginina por una Histidina. Por situarse en el subdominio de “espiral enrollada”, en la zona C-terminal de la proteína ini1 que se encuentra altamente conservado en la filogenia, este triplete es señalado como un “punto caliente” de mutación en este gen por Schmitz y cols. (2001). Esta mutación se encontró en el caso T12, recurrente aunque de grado I, y que tenía LOH en 22q. Este meningioma presentaba también mutación en el gen *NF2*, lo que no apoyaría la hipótesis que define al gen *INII*^{hSNF5} como el gen oncosupresor alternativo a *NF2* en la tumorigénesis de este tipo neoplásico, sino más bien como un mecanismo de inactivación que cooperaría con el ya establecido de inactivación del gen *NF2*.

Los datos obtenidos del análisis mutacional del gen *INII*^{hSNF5} no nos aclaran si su silenciamiento cooperaría con el previamente alterado gen *NF2* como sucede en algunos tumores (p.ej: T12 o T29) o si sería un mecanismo alternativo como parece indicar el meningioma T45.

Sí se han corroborado las discrepancias señaladas por otros autores respecto de la secuencia descrita en el GeneBank (Biegel y cols., 1999) así como presentar otra posible diferencia (del GC) localizada 119 bases “corriente arriba” del intrón 1. También se ha descrito en nuestro trabajo una nueva mutación de cambio de sentido (1136 C > T) que producía el cambio de Arg 377 Cys.

5.1.2.- Genes localizados en 1p

5.1.2.1.- Análisis del gen *TP73*

Estudios de LOH han señalado que la región 1p36 podría estar relacionada con la progresión tumoral en meningiomas (Bello y cols., 1994; Versteeg y cols., 1995; Bello y cols., 2000). Se identificó en 1p36.33 el gen *TP73* (Kaghad y cols., 1997); este

gen aparece como el candidato más firme a oncosupresor de los localizados en dicha región, por la alta homología que presentaba *TP73* con *TP53*, tanto estructural como funcionalmente (Kaghad y cols., 1997; Liu y cols., 2000). En una muy completa revisión de *TP73* que incluía todos los estudios de análisis mutacional realizados hasta ese momento en este gen (Melino y cols., 2002), se ha encontrado una muy baja frecuencia (0,05%) de mutaciones en tumores del SNC. Los autores de esta revisión no aclaran si este gen se ajustaría al comportamiento esperado para un oncosupresor o para un oncogén, existiendo pruebas que apoyan ambas teorías.

La serie utilizada en este estudio se componía de meningiomas con diversos tipos de deleciones en 1p, incluyéndose muestras con y sin pérdidas en 1p36 (zona de localización del gen *TP73*).

La deleción encontrada en el intrón tres (E3/+12) de la muestra T32, grado I, puede tener relación con la presencia en este intrón de un promotor alternativo (P2), cuya activación produce la síntesis de una isoforma de p73 que no presenta los exones 2 y 3 (Δ N-p73) y que según Melino y cols. (2002) podría funcionar como oncogén. Una mutación de este tipo podría distorsionar los dominios reguladores de la activación de este promotor alternativo, con lo que el equilibrio entre las dos isoformas funcionales (TAp73 y Δ N-p73) se desplazaría hacia la forma delecionada en el extremo N-terminal (Δ N-p73). La relación de esta forma con el desarrollo tumoral viene dado por la inhibición de la actividad de p53 y TAp73 y ha sido establecida por diversos grupos (De Laurenzi y cols., 1998; Ueda y cols., 2001; Grob y cols., 2001; Ishimoto y cols., 2002; Melino y cols., 2002).

El otro cambio con una significación funcional se encontró en el exón 5 del meningioma T54, de grado II, que igual que todas las muestras utilizadas en el análisis

mutacional de *TP73* presentaba LOH en 1p, aunque no en la zona 1p36. En este caso se encontró una mutación de cambio de sentido (Asn 204 Ser) producida por una transición (A>G). Este meningioma retenía una copia del alelo normal no habiéndose establecido claramente cual es la implicación molecular de este cambio de aminoácido. El exón 5 de *TP73* se encuentra dentro del dominio de unión a ADN (DBD) implicado de manera directa en la actividad de esta proteína (isoforma TAp73) como factor regulador de la transcripción. Mutaciones de cambio de sentido similares a ésta se han encontrado en *TP53*, como por ejemplo un cambio Ala 161 Thr en el exón 5 de una muestra de meningioma (Wang y cols., 1995), y aunque este aminoácido no está localizado de forma precisa en el DBD si está dentro del área que determina supuestamente la correcta conformación de la proteína (Cho y cols., 1994). Otras mutaciones encontradas en *TP53* fueron Lys 215 His y Ala 135 Val. Éstas ejercen un efecto dominante negativo e incrementan la estabilidad de la proteína mutante frente a la proteína normal (Findlay y cols., 1989); lo que produciría el elevado número de líneas celulares transformadas obtenidas por ellos y apoyaría la actividad tumorigénica de este tipo de mutación tanto en *TP53* como en su homólogo *TP73*.

Ambos meningiomas (T32 y T54) presentan mutación también en el gen *INI1*^{hSNF5}, del que ya hemos comentado su importancia en la génesis de meningiomas (Schmitz y cols., 2001), aunque ninguno de ellos lo está en *NF2*, gen considerado generalmente como el paso inicial en la génesis de este tipo de tumores.

De los nueve tumores con alteración de secuencia en *TP73*, ocho presentan sustituciones nucleotídicas silenciosas que probablemente reflejan polimorfismos de secuencia entre individuos, según reflejan también los resultados de Nomoto y cols. (1998) en cáncer de pulmón y el de Takahashi y cols. (1998) en carcinomas prostáticos.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que son ya contemplados por la revisión de Melino y cols. (2002), no son concluyentes en cuanto a la actividad funcional de *TP73*. Estos resultados junto con los datos aportados por otros autores (Kaghad y cols., 1997; Jost y cols., 1997; De Laurenzi y cols., 1998; Ueda y cols., 2001) sugieren que *TP73* no se comporta siempre como un clásico oncosupresor pues no sigue el modelo de Knudson de inactivación génica en dos pasos (Knudson Jr., 1971 y Knudson, 1993). Además, ambas mutaciones encontradas aparecen en meningiomas que presentan cierto grado de malignidad lo cual puede apoyar la idea de que este gen estaría relacionado con progresión a formas más agresivas.

5.1.2.2.- Análisis del gen *p18^{INK4c}*

El gen *p18^{INK4c}*, localizado en 1p32, codifica para una proteína (p18) perteneciente a la familia de inhibidores de los complejos Ciclinas-CDK (quinasas dependientes de ciclinas). Su función de regulador del ciclo celular le ha señalado como un buen candidato a oncosupresor (Boström y cols., 2001).

En el estudio presentado aquí se encontraron 2 alteraciones de secuencia en el gen *p18^{INK4c}* en 4 meningiomas. Una de las variaciones fue un polimorfismo sin consecuencias fenotípicas, mientras que la otra fue una inserción de tres bases al final del intrón 2, y que por ubicarse tras la señal aceptora del mecanismo de eliminación intrónica teóricamente produciría la aparición de un nuevo aminoácido, Valina en el codón 45. Ambas alteraciones estaban presentes también en los correspondientes ADN de sangre periférica. De los 4 tumores con variación solo uno fue de grado II, a pesar de que la muestra estaba formada en su mayor parte por tumores de alto grado.

Nuestros resultados apoyan la tesis, ya apuntada, de una muy escasa aparición de mutaciones en el gen *p18^{INK4c}* en meningiomas (Santarius y cols., 2000; Leuraud y cols.,

2000; Boström y cols., 2001); por tanto este mecanismo no sería el involucrado preferentemente en la inactivación de $p18^{INK4c}$ ni en la progresión de este tipo tumoral. El estudio de un mayor número de casos dará en el futuro una idea más ajustada sobre el papel que podría jugar este gen en el mecanismo de progresión tumoral de los meningiomas.

5.2.- ANÁLISIS EPIGENÉTICO

5.2.1.- Promotor del gen *NF2*

La metilación de las islas CpG dentro de los promotores de los GST es una vía alternativa de inactivación transcripcional y por tanto de supresión de la expresión, que proporciona una ventaja selectiva en el desarrollo de células tumorales (Jones, 1996). Esta vía se incluye en el modelo clásico de inactivación de un GST (Jones, 1996; Baylin y cols., 1998) conocido como hipótesis “two hits” originalmente propuesta para explicar la inactivación del gen responsable del retinoblastoma (Knudson Jr., 1971 y Knudson, 1993).

Como segundo objetivo de este estudio se proponía el análisis del estado de metilación de las islas CpG del promotor del gen *NF2*. La finalidad fue buscar un mecanismo alternativo a la mutación como método de inactivación de oncosupresores; ya que como hemos comentado la metilación aberrante de las zonas 5' reguladoras de este tipo de genes estaría asociada al desarrollo tumoral al impedir o silenciar su expresión génica (Jones, 1996; Baylin y cols., 1998; Herman, 1999; Baylin y Herman, 2000). Para ello se estudió el estado de metilación de las islas CpG de su promotor en 88 de los 105 tumores en que se realizó el análisis mutacional del gen *NF2*.

Los únicos trabajos que analizan también el estado de metilación del gen *NF2*,

aunque en schwannomas, encuentran frecuencias de hipermetilación dispares. Kino y cols. (2001) obtienen un 61% (14/23), algo mayor que la obtenida en nuestro trabajo, y González-Gómez y cols. (2003c) un 18% (8/44). Los cebadores utilizados por Kino y cols. (2001) son cinco juegos distintos, ya que investigan la metilación de cada isla CpG por separado; mientras que en nuestro estudio se ha utilizado una sola pareja de cebadores, cuyo amplificado incluye las cinco islas CpG estudiadas en el trabajo de Kino y cols. (2001) y responsables del silenciamiento del gen *NF2*.

Siguiendo con la relación entre mutación en el gen *NF2* y metilación en el promotor de dicho gen, en aquellas muestras de la serie en las que se había realizado previamente el estudio de LOH en 22q, zona donde se ubica el gen *NF2* (Bello y cols., 1993 y Rey y cols., 1993), se encontraron 11 meningiomas en los que coincidían ambos sucesos (metilación y mutación) y dos de esos 11 no presentaron pérdida en 22q. En estos dos últimos casos (T44 y T77) la mutación es del tipo cambio de marco y produce una proteína truncada que no sería funcional, lo que sumado al alelo inactivado por hipermetilación permitiría explicar la génesis tumoral de estos meningiomas por pérdida de expresión del gen *NF2*.

La hipermetilación del promotor en *GST* ha sido relacionada con los pasos iniciales de la tumorigénesis (Esteller y Herman, 2002; Esteller, 2003), encontrándose pruebas de ello en estudios sobre tumores del Sistema Nervioso Central. En el realizado por Alonso y cols. (2003), sobre oligodendrogliomas, se encontraron altos porcentajes de metilación de otros genes en neoplasias de bajo grado (*MGMT* con un 77%, *GSTP1* con un 72%) y en el llevado a cabo por González-Gómez y cols. (2003a) en gliomas astrocíticos (*MGMT* con un 58%, *THBS1* con un 51%, *p16^{INK4a}* con un 49%). En nuestro trabajo se encontró mayor frecuencia de metilación alterada en los meningiomas

de bajo grado lo que corroboraría que la metilación ocurre en etapas tempranas del desarrollo de meningiomas, aunque las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas entre estos y los de grado II y III.

Se analizaron las frecuencias de hipermetilación para el promotor del gen *NF2* respecto a diversos parámetros relacionados con el fenómeno tumoral o aspectos clínico-patológicos (LOH en 1p y 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo y edad), las proporciones obtenidas por grupo se detallan en la tabla XI. No se encontraron diferencias significativas dentro de estos parámetros.

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran, para el gen *NF2*, que la metilación de las islas CpG dentro de los promotores de los GST puede representar una vía alternativa de inactivación transcripcional y por tanto de supresión de la expresión en meningiomas. Estos resultados se añaden a la cada vez más abundante lista de resultados obtenidos en el mismo sentido por otros grupos (Corn y cols., 1999; Esteller y cols., 1999 y 2000d; Catteau y cols., 1999; González-Gómez y cols., 2003a y 2003b; Alonso y cols., 2003) para diversos oncosupresores como *p16^{INK4a}*, *RB1*, *TP53*, *BRCA1*, *TP73* y en una amplia selección de tipos tumorales distintos (gliomas, oligodendrogliomas, ependimomas, neuroblastomas, linfomas, meduloblastomas,...).

5.2.2.- Patrón de metilación

Los investigadores que han analizado el patrón de metilación aberrante de las islas CpG en diversos tipos de neoplasias han resaltado la posible existencia de un perfil de hipermetilación que definiría cada tipo tumoral (Esteller y cols., 2001c; Esteller, 2003). Esto ha llevado a algunos grupos a intentar definir un patrón propio de metilación de cada tipo de cáncer humano. Para obtener este patrón es necesario utilizar

genes marcadores que no tengan sus promotores hipermetilados en las células normales y es conveniente utilizar varios genes, para poder extraer la máxima información posible, debido a que los sucesos de hipermetilación en los diferentes loci utilizados son independientes (Esteller y cols., 2001c).

Como tercer objetivo de nuestro estudio y utilizando 10 genes relacionados con el fenómeno tumoral o localizados en cromosomas que suelen presentar anomalías en este tipo tumoral, se planteó:

- a) Verificar la posible implicación de la inactivación por metilación aberrante de estos genes en el desarrollo de los meningiomas.
- b) Tratar de definir un patrón de metilación representativo de este tipo tumoral. Con este patrón se podría diferenciar a los meningiomas de otros tipos tumorales del SNC y también definir subgrupos dentro de este tipo de neoplasias.

Para cuantificar estas diferencias se ha utilizado el IM medio para cada parámetro y como se puede observar en la tabla XIII solo son estadísticamente significativas las diferencias en cuanto al parámetro edad. Se pueden establecer diferencias en el patrón de metilación en nuestra serie entre los tumores de pacientes con 50 o menos años (IM = 0,218) y aquellos pertenecientes a pacientes con más de esa edad (IM = 0,295). El mayor valor en los tumores de personas con más edad puede estar relacionado con un efecto acumulativo de la hipermetilación en los genes que forman el patrón de metilación estudiado aquí. Para el resto de parámetros analizados (LOH en 1p y 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo) no se encuentran diferencias significativas, con valores del IM medio por grupo cercano a 0,26 (tabla XIII) que no se desvía apreciablemente del IM de la muestra en total (IM = 0,265).

Es destacable la existencia de solo dos meningiomas sin hipermetilación en el total de genes estudiados. Ello supone un 97% de tumores metilados en al menos un gen. Ambos casos (T2 y T66) son de tipo histológico transicional, dispares en cuanto a la edad y el sexo, y con distinto grado de malignidad, respectivamente grado I y II, también coinciden en no presentar mutación en ninguno de los genes analizados en nuestro trabajo.

El meningioma T2 no presentó LOH en ninguno de los cromosomas estudiados (1p, 14q, 22q) con anterioridad (Bello y cols., 1993, 1994 y 2000; Rey y cols., 1993; Leone y cols., 1999 o datos no publicados). Se encontraría dentro de ese grupo de meningiomas esporádicos en los que no se ha conseguido explicar el origen molecular de la neoplasia, quizás a la espera de la identificación de otro GST o de otro mecanismo de inactivación génica no identificado hasta ahora.

En parecida situación se encuentra el meningioma T66 aunque presenta LOH en todas las zonas anteriormente citadas, lo cual apunta a que un segundo suceso inactivador (según el modelo de Knudson) se debe buscar en esas regiones. Se han realizado abundantes estudios (Peyrard y cols., 1994; Mendiola y cols., 1999; Boström y cols., 1998; Husemann y cols., 1999; He y cols., 2000; Boström y cols., 2001; Santarius y cols., 2000; Leraud y cols., 2000) en busca de otros GST en esas zonas pero hasta ahora aunque se han encontrado algunos, no parecen estar alterados en este tipo tumoral.

A esta discusión de los resultados del análisis del patrón de metilación se han incorporado los de esos 60 tumores en el promotor del gen *NF2*, con la pretensión de comparar los grados de metilación de este gen y los del resto de genes analizados. El porcentaje de metilación aberrante que se obtiene en el gen *NF2* fue similar al obtenido

para el total de nuestra serie, no siendo significativamente distintos ambos porcentajes. Los parámetros incluidos en nuestro estudio (LOH en 1p y 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo, edad) no presentaron diferencias de porcentaje de metilación estadísticamente significativas para este gen.

En la tabla XIV se han reunido los porcentajes de metilación, para los genes analizados en nuestro estudio, obtenidos en trabajos realizados por otros grupos y poder así compararlos con los que se han conseguido en nuestro trabajo.

TIMP-3 codifica para una proteína de unión a la matriz extracelular que inhibe angiogénesis, invasión y metástasis, *THBS1* es un inhibidor de la angiogénesis y *DAPK* actúa inhibiendo la metástasis como intermediario positivo de la apoptosis (Bachman y cols., 1999; Roberts, 1996; Kissil y cols., 1997).

Los datos obtenidos para *TIMP-3* aquí son comparables a los de González-Gómez y cols. (2003a) en astrocitomas de grado II, existiendo también estudios que obtienen porcentajes menores como Bachman y cols. (1999) en tumores de origen astrocítico (estos autores le adjudicaron un papel como GST) y Alonso y cols. (2003) en oligodendrogliomas y ependimomas (tabla XIV). En cuanto a *THBS1*, el porcentaje de metilación obtenido en nuestro trabajo (32%) es muy parecido al obtenido por Li y cols. (1999) en glioblastomas primarios, y al de Alonso y cols. (2003) en oligodendrogliomas pero apreciablemente menor que los obtenidos por González-Gómez y cols. (2003a).

En relación a *DAPK*, en los trabajos de Dong y cols. (2001) y Alonso y cols. (2003) en oligodendrogliomas y González-Gómez y cols. (2003a) en astrocitomas, se asocia su hipermetilación a formas anaplásicas de estos tipos tumorales. El porcentaje de metilación de Dong y cols. (2001) sí es comparable con el nuestro, mientras que los

del resto de trabajos reseñados son más altos que el obtenido en nuestro estudio (tabla XIV). Dentro de nuestro trabajo el porcentaje mayor aparece en los meningiomas de bajo grado, 23%, frente a un 9% en los de grado II y un 0% en los de grado III, lo que no coincidiría con las conclusiones expuestas por Dong y cols. (2001), Alonso y cols. (2003) y González-Gómez y cols. (2003a).

En nuestra serie aparecen diferencias significativas en los porcentajes de hipermetilación de *THBS1* y de *DAPK*, según presenten o no los tumores LOH en 1p. En *DAPK* los meningiomas que no presentan pérdida en 1p están más metilados que los que sí la presentan ($p < 0,006$). El gen *THBS1* está hipermetilado con mayor frecuencia en los tumores con pérdida en 1p que los que no la presentan ($p < 0,002$). En el gen *TIMP-3* también se han encontrado diferencias a favor del subgrupo con LOH en 1p, aunque no son estadísticamente significativas. Estos resultados podrían ser una prueba más de la acumulación de alteraciones que en estas neoplasias explicarían la progresión tumoral (Simon y cols., 1995; Weber y cols., 1997; Leone y cols., 1999). Si esto fuera así se podría asociar también en meningiomas la hipermetilación de estos genes (*TIMP-3*, *THBS1* y *DAPK*), todos ellos relacionados con progresión tumoral, con su evolución a formas más agresivas como postulan los trabajos de Dong y cols. (2001), Alonso y cols. (2003) y González-Gómez y cols. (2003a) para otros tipos tumorales del SNC.

Es el mismo locus, 9p21, el que codifica para *p16^{INK4a}* y *p14^{ARF}*. Estos genes son traducidos a partir de ARN mensajeros generados por splicing alternativo en ese locus, y su expresión es regulada por promotores diferentes (Xing y cols., 1999). Las proteínas codificadas por estos genes inhiben el paso de fase G1 a fase S en el ciclo celular a través de dos vías distintas pero complementarias y relacionadas entre sí. A través de la vía de *RB1* actúa *p16^{INK4a}*, mientras que *p14^{ARF}* lo hace por la vía de *TP53* (Robertson y

cols., 1998).

En nuestro trabajo se han encontrado unos porcentajes de metilación aberrante de alrededor del 25% para $p16^{INK4a}$ y $p14^{ARF}$. Para otro tipo de tumores del SNC, en los de origen no astrocítico (oligodendrogliomas de diverso grado y ependimomas) los valores obtenidos son heterogéneos; parecidos para ambos genes en Wolter y cols. (2001) y con valores dispares, más altos en $p14^{ARF}$ que en $p16^{INK4a}$, en los trabajos de Watanabe y cols. (2001) y Alonso y cols. (2003). En los de origen astrocítico (astrocitomas de diverso grado y glioblastomas) los porcentajes de $p16^{INK4a}$ son más altos que los de $p14^{ARF}$ (González- Gómez y cols., 2003a) (tabla XIV).

El conjunto de resultados obtenidos por distintos grupos, así como el nuestro, en diferentes tipos de tumores, tanto del SNC como de otras localizaciones, apuntarían a un relevante papel de estos genes ($p14^{ARF}$ y $p16^{INK4a}$) mediante la hipermetilación de sus promotores en la patogénesis tumoral (Wong y cols., 1999; Xing y cols., 1999; Esteller y cols., 2000d; Wolter y cols., 2001; Watanabe y cols., 2001; Alonso y cols., 2003; González-Gómez y cols., 2003a). En el único trabajo existente en meningiomas (Yin y cols., 2002) no se obtiene hipermetilación para $p16^{INK4a}$ y un valor parecido al nuestro para $p14^{ARF}$. Su conclusión es que la inactivación de $p16^{INK4a}$ y $p14^{ARF}$ por metilación no jugaría un papel importante en el desarrollo de los meningiomas. Una posible explicación para estos resultados contradictorios sería que la serie de meningiomas analizada por nosotros es mayor que la utilizada en el trabajo de Yin y cols. (2002); estos investigadores analizaron 19 tumores frente a los 60 estudiados por nosotros.

Como ya apuntaban Xing y cols. (1999) en su trabajo sobre carcinomas de células escamosas esofaríngeas, la cometilación de ambos genes no es un fenómeno frecuente, observándose en nuestro estudio sólo en 5 meningiomas metilación de ambos

genes.

De los parámetros analizados (LOH en 1p y 22q, grado de malignidad, tipo histológico, sexo y edad) solo se han obtenido diferencias significativas en el porcentaje de metilación para el parámetro sexo en el gen *p16^{INK4a}*, 35% en mujeres y 6% en varones, lo que se explicaría por la mayor tasa de aparición de meningiomas en el sexo femenino que en el masculino señalada en la bibliografía (Zang, 1982).

La proteína codificada por el gen *RBI* (pRB) es un eslabón más de la vía, que lleva su nombre, de regulación del ciclo celular; representando un clásico ejemplo de GST y un candidato idóneo para el estudio de su estado de metilación. En nuestro trabajo se ha obtenido para el gen *RBI* un porcentaje de metilación del 13%, además para ninguno de los parámetros analizados se han encontrado diferencias apreciables, ni mucho menos significativas. Solo hay otro trabajo que estudie el grado de metilación en meningiomas Yin y cols. (2002) encontrando un valor del 5% (1/19) más bajo aún que el obtenido por nosotros.

En otras neoplasias del SNC se han encontrado valores de metilación de *RBI* muy heterogéneos. En oligodendrogliomas se encuentra desde ausencia de hipermetilación (Yin y cols., 2002; Alonso y cols., 2003), valores alrededor del 13% (Watanabe y cols., 2001) hasta porcentajes mayores (Dong y cols., 2001), mientras que en tumores de origen astrocítico González-Gómez y cols. (2003a) encuentra valores mayores del 13%, tabla XIV.

La actividad inhibidora de pRB impide el paso de G1 a S, estando regulada a su vez por la actividad de *p16^{INK4a}* (Friend y cols., 1986; Lee y cols., 1987; Buchkovich y cols., 1989). La pérdida de actividad en cualquiera de las dos proteínas produce una desregulación del ciclo celular y es una vía de génesis tumoral (Medema y cols., 1995).

Debido a ésto se podría esperar que la hipermetilación de estos dos genes (*RBI*, *p16^{INK4a}*) fuera complementaria y no existiera solapamiento entre ellos, ya que actúan en la misma vía y la célula procura economizar en todo lo posible. Ello sucede así en nuestra serie, ya que aparecen solo 2 meningiomas con hipermetilación coincidente en ambos genes. Estas dos muestras (T23 y T81) son de grado II. La primera tiene un índice de metilación de 0.6, siendo bastante significativo que casi todos sus genes metilados (*DAPK*, *THBS1* y *TIMP-3* por un lado, *RBI* y *p16^{INK4a}* por otro y *MGMT*) han sido relacionados en la literatura con progresión a formas más agresivas en cáncer de mama, pulmón, colorectal, carcinomas gástricos y oligodendrogliomas (Hui y cols., 2000; Esteller y cols., 2001b; Hoon Kang y cols., 2001; Watanabe y cols., 2001; Dong y cols., 2001). El meningioma T81 presenta un IM de 0.4 y los genes metilados son *RBI*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}* y *NF2*, los tres primeros relacionados con progresión tumoral; además T81 presentaba LOH en 1p y 22q. Estos resultados son apoyados por los obtenidos por Simpson y cols. (2001) que encontraron pérdida de expresión en los genes *p16^{INK4a}* o *RBI* en el 51% de los adenomas de hipófisis analizados y solo en 5 tumores (11%) la pérdida de expresión se detectó en ambos genes. Parece por tanto que quedaría reforzada la idea de una asociación entre la pérdida de actividad en estos genes, debida en este caso a la metilación aberrante del promotor de uno u otro gen, y el desarrollo neoplásico.

Otro de los GST en los que se ha estudiado la metilación de la región 5' flanqueante es *TP73*, un homólogo estructural y funcional de *TP53*, que mapea en 1p36.33. Esta región del genoma se encuentra delecionada entre el 10 y el 20% de los tumores del SNC y en meningiomas esta asociada a progresión tumoral.

En nuestra serie de tumores se ha obtenido un porcentaje del 23% de casos con

metilación aberrante; obteniéndose diferencias significativas ($p < 0.05$) en la frecuencia de metilación entre los tumores con LOH en 1p (33%) y los que no lo tienen (13%), datos incluidos en Lomas y cols. (2004). Estos resultados sugerirían que la alteración de la expresión del gen por metilación estaría asociada en meningiomas a deleciones en 1p, un acontecimiento relacionado a la génesis de formas atípicas (grado II) de meningioma (Bello y cols., 1994; Lindblom y cols., 1994; Simon y cols., 1995; Weber y cols., 1997; Leone y cols., 1999; Lamszus y cols., 1999; Cai y cols., 2001). Nuestros datos indicarían que la hipermetilación de *TP73* podría estar ligada a la progresión de meningiomas. Esta conclusión no se ve refrendada por los resultados del análisis cuando dividimos la serie según el grado de malignidad, encontrando metilación de *TP73* en 7 de 35 tumores de grado I (20%) frente a 6 de 25 de grado II-III (24%). Según estos resultados los cambios epigenéticos en *TP73* no parecerían estar asociados al grado de malignidad en esta neoplasia.

La inactivación del gen *TP73*, debido a la metilación aberrante de las islas CpG de su promotor, podría sin embargo caracterizar a un subgrupo de meningiomas de grado I. Esta forma de actuar de *TP73*, como si fuera un típico GST, es distinta a la que proponen para este gen en algunos meningiomas malignos Nozaki y cols. (2001). Estos autores asocian el incremento de la expresión del gen *TP73* con la tumorigénesis. Solo estudios combinados de metilación y expresión génica pueden aclarar este comportamiento del gen *TP73*. Si se confirmara esta doble actividad, oncogénica por un lado e inhibidora del ciclo celular y apoptótica por el otro se podrían diferenciar dos subgrupos de meningiomas. Aquellos meningiomas que desarrollarían formas de grado I del tumor y que por pérdida de la expresión del gen debido a hipermetilación podrían evolucionar hacia formas de grado II; frente a otro grupo en el que por aumento de la

expresión del gen, según Nozaki y cols. (2001), se producirían meningiomas malignos (grado III).

El gen *MGMT* codifica para una enzima que forma parte del sistema de reparación de ADN, la O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa. Múltiples son los trabajos que evidencian la relación entre la alteración epigenética en este gen y el fenómeno tumoral (Esteller y cols., 1999; Danam y cols., 1999; Nakamura y cols., 2001; González-Gómez y cols., 2003a; Alonso y cols., 2003). Las consecuencias del cambio en el patrón de metilación en las islas CpG del promotor de este gen son principalmente:

- Aumento de la frecuencia de mutación por transiciones en genes como *K-RAS* y *TP53*, debido a la ausencia de actividad de *MGMT* en tumores de cerebro, pulmón y colorectales (Esteller y cols., 2000c y 2001a; Nakamura y cols., 2001). Sería un factor de mayor agresividad biológica.
- Una mejor respuesta de los pacientes con gliomas a quimioterapia y por tanto un mayor grado de supervivencia de estos (Esteller y cols., 2000a; Gerson, 2002). Siendo por tanto un factor de mejor pronóstico.

En la serie de meningiomas estudiada por nosotros se obtiene una proporción del 22% (13/60) de casos hipermetilados en el gen *MGMT*. En ninguno de los parámetros analizados se advierten diferencias significativas. Se han encontrado proporciones altas de hipermetilación (tabla XIV) en tumores astrocíticos y oligodendrogiales (Dong y cols., 2001; Esteller y cols., 1999; Nakamura y cols., 2001; Alonso y cols., 2003; González-Gómez y cols., 2003a). En una serie de endimomas Alonso y cols. (2003) obtienen valores parecidos al nuestro. Los únicos trabajos que lo analizan en meningiomas son los de Esteller y cols. (1999) que no encuentra ninguno caso metilado

(0/25) y el de Yin y cols., (2003) que obtiene un 42% (8/19). Las diferencias de valores entre estos trabajos y el nuestro puede deberse al pequeño tamaño de las series analizadas por estos investigadores. Un reciente estudio, que correlaciona LOH en diferentes zonas del cromosoma 10 y diversos parámetros con implicaciones clínicas (Mihaila y cols., 2003a y 2003b), no encuentra asociación entre ninguno de estos parámetros y la zona donde se localiza *MGMT* (10q24.33). Solo el estudio de un mayor número de meningiomas nos dará una medida más aproximada del papel que juega la alteración epigenética de *MGMT* en la génesis y progresión de este tipo tumoral.

El último gen de los estudiados en el patrón de metilación es *ER*, que codifica para el receptor de estrógeno, a causa del importante papel que juegan las hormonas esteroides en el desarrollo de meningiomas y el mayor grado de incidencia de esta neoplasia en mujeres (Brandis y cols., 1993; Maxwell y cols., 1993; Hsu y cols., 1997). El porcentaje obtenido en nuestro estudio fue del 18%. Los datos en la literatura sobre la metilación de este gen son escasos y además buena parte de ellos se realizan utilizando enzimas de restricción y *southern blot*, una técnica distinta a la utilizada en este trabajo (MSP). Utilizando la misma metodología que nosotros Dong y cols. (2001) encontraron un 30% de oligodendrogliomas metilados, porcentaje algo mayor que el detectado en nuestro estudio. En el trabajo de O'Doherty y cols. (2002) se ha asociado en líneas celulares de epitelio ovárico la pérdida de expresión de *ER* con la hipermetilación en el sitio NotI de las islas CpG de este gen, 3 líneas hipermetiladas de 7 sin expresión del gen *ER*. Porcentajes altos de hipermetilación se han encontrado (entre 60% y 80%) en tejido prostático tumoral (Li y cols., 2000) asociándose a progresión tumoral. Aunque la asociación entre metilación alterada y pérdida de expresión está bastante clara para estos últimos autores; el mecanismo por el cual puede actuar *ER* en el proceso de génesis y

progresión tumoral no lo está. Se ha sugerido que *ER* tendría un papel de GST (Issa y cols., 1994), pues este receptor tiene propiedades de supresión de metástasis en tumores de mama (el-Deiry y cols., 1991) y suprime también el desarrollo en diferentes tipos de células tumorales cultivadas *in vitro* (Belinsky y cols., 1996). En nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas de proporción ni entre los diferentes grados de malignidad ni en cuanto a su asociación al sexo. El estudio de series más amplias de meningiomas es necesario para aclarar la posible incidencia de la alteración de este gen en su génesis y progresión.

En cuanto al objetivo de encontrar un patrón de metilación característico de meningiomas, al comparar los resultados obtenidos por nosotros con estudios similares en otras neoplasias de SNC (Alonso y cols., 2003; González-Gómez y cols., 2003a) encontramos:

- Genes más frecuentemente metilados que en los otros tipos de tumor como son *TIMP-3* (43% vs. 24% y 21%).
- Genes menos frecuentemente metilados: *MGMT* (22% vs. 80% y 58%), *DAPK* (17% vs. 66% y 35%) y *THBS1* (32% vs. 39% y 51%).
- Genes con proporciones parecidas a las obtenidas por nosotros, en oligodendrogliomas (Alonso y cols., 2003): *TP73* (23% vs. 24%) y también *p16^{INK4a}* (27% vs. 24%).

Por tanto estos genes (*TIMP-3*, *MGMT*, *DAPK*, *THBS1*) podrían ser incluidos en un patrón de metilación específico de meningiomas, en el que debería ser incluido también *NF2* por su relevancia en la génesis de este tipo tumoral.

Tabla XIV.- Porcentajes de muestras hipermetiladas en la bibliografía.

Tumor GEN	TESIS	Alonso y cols. 2003		González-Gómez y cols. 2003a			Dong y cols. 2001	Yin y cols. 2002	Watanabe y cols. 2001		Bachman y cols. 1999	Li y cols. 1999	Wolter y cols. 2001	Esteller y cols. 1999		Nakamura y cols. 2001	
	M	O	E	GB	A		O	M	O	III	A	GB	O	G	M	A	GB
					II	III			II	III						(II)	
<i>TIMP-3</i>	43	24	28	21	46	14					26						
<i>THBS1</i>	32	39	0	51	79	57						33					
<i>DAPK</i>	17	66	57	35	4	48	10										
<i>p16^{INK4c}</i>	27	0	14	49	64	62	12	0	0	5			32				
<i>p14^{ARF}</i>	23	44	28	14	8	24	2	26	21	14			41				
<i>RB1</i>	13	0	0	21	37	14	34	5	4	10							
<i>TP73</i>	23	24	14	12	12	29	16										
<i>MGMT</i>	22	80	28	58	50	71	60							38	0	48	75
<i>ER</i>	17						30										

(M) Meningioma, (O) Oligodendroglioma, (E) Ependimoma, (GB) Glioblastoma, (A) Astrocitoma, (G) Glioma.

(II y III) → Grados de malignidad.

6.- CONCLUSIONES

- 1) Los resultados obtenidos del análisis mutacional del gen *NF2*, en nuestro estudio, confirman el papel decisivo de este gen en la génesis de meningiomas esporádicos. Se han encontrado 6 mutaciones no descritas previamente en *NF2* y se propone la existencia de posibles puntos calientes en los tripletes CAG y CGA de este gen.
- 2) Tanto la proporción de casos alterados como el tipo de alteraciones encontradas en el análisis mutacional del gen *INI1^{hSNF5}* no nos permiten asignar a este gen un papel concreto en la génesis de meningiomas. Se han encontrado 3 mutaciones de cambio de sentido, todas en el exón 9, dos en el codón 377 y una de ellas no publicada anteriormente. También se ha confirmado la existencia de discrepancias entre la secuencia obtenida y la descrita en el GeneBank, lo que puede reflejar la existencia de variantes polimórficas en la población estudiada.
- 3) Los genes *p18^{INK4c}* y *TP73*, localizados en 1p, no estarían asociados a progresión tumoral en meningiomas por alteraciones en su secuencia. En *TP73* se ha localizado una mutación de cambio de sentido, en el exón 5, no descrita previamente.
- 4) La hipermetilación, en la mayor parte de los genes estudiados, jugaría un importante papel en la patogénesis y progresión de meningiomas.
- 5) La metilación alterada en el promotor del gen *NF2* es un mecanismo alternativo de pérdida de expresión en este gen para un importante porcentaje de meningiomas. Se encuentra una mayor frecuencia de metilación aberrante en los meningiomas de grado I lo que corroboraría la idea de que este acontecimiento sucede en etapas tempranas del desarrollo tumoral en meningiomas.

- 6) El papel que juega *TP73* en la progresión de meningiomas parece estar más relacionado con la pérdida de expresión mediada por hipermetilación que con la inactivación debida a mutación en la secuencia codificante de este gen.
- 7) La inactivación por metilación aberrante del gen *TP73* podría caracterizar a un subgrupo de meningiomas de grado I que evolucionarían hacia formas atípicas (grado II).
- 8) Los genes *DAPK*, *MGMT*, *NF2*, *THBS1*, *TIMP-3* y *TP73* podrían ser incluidos en un patrón de metilación representativo de meningiomas, bien por que su grado de metilación los diferencia de otros tipos tumorales del SNC o por que caracterizan a distintos subgrupos de meningiomas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

Al Saadi A, Latimer F, Madercic M, and Robbins T (1987). Cytogenetic studies on human brain tumors and their clinical significance. II, Meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 26: 127-141.

Alonso M.E, Bello M.J, González-Gómez P, Lomas J, Arjona D, de Campos J.M, Kusak M.E, Sarasa J.L, Isla A, and Rey J.A (2001). Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer* 85: 204-208.

Alonso M.E, Bello M.J, Arjona D, González-Gómez P, Lomas J, de Campos J.M, Kusak M.E, Isla A, and Rey J.A (2002). Analysis of the NF2 gene in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 134: 1-5.

Alonso M.E, Bello M.J, González-Gómez P, Arjona D, Lomas J, de Campos J.M, Isla A, and Rey J.A (2003). Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 143: 1-9.

Arakawa H, Hayashi N, Nagase H, Ogawa M, and Nakamura Y (1994). Alternative splicing of the NF2 gene and its mutation analysis of breast and colorectal cancers. *Hum Mol Genet* 3, 4: 565-68.

Bachman KE, Herman J.G, Corn P.G, Merlo PG, Costello J.F, Cavenee W.K, Baylin S.B, and Graff J.R (1999). Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 59: 798-802.

Balaña C, Ballester R, Prindesis R, and Vallejos V (2001). Cáncer del Sistema Nervioso Central. *Medicine* 8(56): 3014-23.

Bandera CA, Takahashi H, Behbakht K, Liu PC, LiVolsi VA, Benjamin I, Morgan MA, King SA, Rubin SC, and Boyd J (1997). Deletion mapping of two potential chromosome 14 tumor suppressor gene loci in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 57(3): 513-5.

Baser M, Mautner V-F, ThakkarSD, and Kluwe L (1998). The natural history of neurofibromatosis 2. *Am J Hum Genet* 63(suppl 4): A63.

Baser M, Evans D.G, and Gutmann D.H (2003). Neurofibromatosis 2. *Curr Opin Neurol* 16: 27-33.

Baylin S.B, Herman J.G, Graff J.R, Vertino P.M, and Issa J.P.J (1998). Alteration in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. In "Advances in Cancer Research" (Vande Woude G.F and Kleine G, Eds.), pp. 141-196, Academic Press, Inc., San Diego.

Baylin S.B and Herman J.G (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16: 168-74.

Belinsky SA, Nikula KJ, Baylin S.B, and Issa J.P.J (1996). Increased cytosine DNA methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci* 93: 4045-50.

Bello M.J, de Campos J.M, Vaquero J, Kusak M.E, Sarasa J.L, Rey J.A, and Pestaña A (1993). Chromosome 22 heterozygosity is retained in most hyperdiploid and pseudodiploid meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 66: 117-119.

Bello M.J, de Campos J.M, Kusak M.E, Vaquero J, Sarasa J.L, Pestaña A, and Rey J.A (1994). Allelic loss at 1p is associated with tumor progression of meningiomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 9: 296-98.

Bello M.J, de Campos J.M, Kusak M.E, Vaquero J, Sarasa J.L, García-Miguel P, Queizan A, Hernández-Moneo J.L, Pestaña A, and Rey J.A (1995). Allelic status of chromosome 1 in neoplasms of the Nervous System. *Cancer Genet Cytogenet* 83: 160-164.

Bello M.J, de Campos J.M, Vaquero J, Kusak M.E, Sarasa J.L, and Rey J.A (2000). High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 120: 30-36.

Benito M (1999). Genes Supresores. In "Proliferación celular y Cáncer" (Cascales M and Villanueva J.R, Eds.), pp. 237-256, Ed. Fundación Científica de la AECC, Madrid.

Bianchi A.B, Hara T, Ramesh V, Gao J, Klein-Szanto A.J.P, Menon A.G, Troffater J.A, and Gusella J.F (1994). Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types. *Nature Genetics* 6: 185-92.

Biegel J.A, Allen C.S, Kawasaki K, Shimizu N, Budarf M.L, and Bell C.J (1996). Narrowing the critical region for a rhabdoid tumor locus in 22q11. *Genes, Chromosomes & Cancer* 16: 94-105.

Biegel J.A, Zhou J-Y, Rorke L.B, Stenstrom C, and Wainwright L.M Fogelgren B (1999). Germ-line and acquired mutations of INI1 in Atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res* 59: 74-79.

Biegel J.A, Fogelgren B, Zhou J-Y, James C.D, Janss A.J, Allen J.C, Zagzag D, Raffel C, and Rorke L.B (2000). Mutations of the INI1 rhabdoid tumor suppressor gene in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Clin Cancer Res* 6: 2759-63.

Biegel J.A, Kalpana G.V, Knudsen E.S, Packer R.J, Roberts Ch.W.M, Thiele C.J, Weissman B.E, and Smith M (2002). The role of INI1 and the SWI/SNF complex in the development of rhabdoid tumors: meeting summary from the workshop on childhood atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cancer Res* 62: 323-28.

Bijlsma E, Merel P, Boström J, Bosch D.A, Westerveld A, Delattre O, Thomas G, and Hulsebos T.J.M (1994). Analysis of mutation in the SCH gene in Schwannomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 11: 7-14.

Boström J, Cobbers JM, Wolter M, Tabatabai G, Weber R.G, Lichter P, Collins V.P, and Reifenberger G (1998). Mutation of the PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but no in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 58(1): 29-33.

Boström J, Meyer-Puttlitz B, Wolter M, Blaschke B, Weber R.G, Lichter P, Ichimura K, Collins P, and Reifenberger G (2001). Alterations of the tumor suppressor gene CDKN2A (p16/ INK4a), p14(ARF), CDKN2B(p15/ INK4b), and CDKN2C(p18/ INK4c) in atypical and anaplastic meningiomas. *Am J Pathol* 159(2): 661-69.

Bourn D, Carter S.A, Mason S, Evans D.G.R, and Strachan T (1994). Germline mutations in the neurofibromatosis type 2 tumour suppressor gene. *Genes, Chromosomes & Cancer* 12: 117-27.

Brandis A, Mirzai S, Tatagiba M, Walter GF, Samii M, and Ostertag H (1993). Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurgery* 33: 212-18.

Brault E, Gautreau A, Lamarine M, Callebaut I, Thomas G, and Goutebroze L (2001). Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. *J Cell Sci* 114: 747-55.

Bruder C.E, Dumansky J.P, and Kedra D (1999). The mouse ortholog of the human *SMARCB1* gene encodes two splice forms. *Biochem Biophys Res Comm* 257: 886-90.

Buchkovich K, Duffy LA, and Harlow E (1989). The retinoblastoma gene is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58: 1097-1105.

Cai DX, Banerjee R, Scheithauer B.W, Lohse CM, Kleinschmidt-Demasters BK, and Perry A (2001). Chromosome 1p and 14q FISH analysis in clinicopathologic subset of meningiomas: Diagnostic and prognostic implications. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 628-36.

Cairns J (1977). "Cancer: Science and Society," W. H. Friedman and Co., San Francisco.

Carroll R.S, Zhang J, and Black P.McL (1999). Expression of estrogen receptors alpha y beta in human meningiomas. *J Neuro-Oncology* 42: 109-16.

Casalone R, Granata P, Simi P, Tarantino E, Butti G, Buonaguidi R, Faggiomato F, Knerich R, and Solomon E (1987). Recessive cancer genes in meningiomas? An analysis of 31 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 27: 145-49.

Casalone R, Simi P, Granata P, Minelli E, Giudici A, Butti G, and Solero C.L (1990). Correlation between cytogenetic and histopathological findings in 65 human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 45: 237-44.

Cassartelli C, Rogatto S.R, and Neto JB (1989). Karyotypic evolution of human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 40: 33-45.

Catteau A, Harris WH, Xu CF, and Solomon E (1999). Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. *Oncogene* 18: 1957-65.

Chen R.Z, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, and Jaenisch R (1998). DNA hypomethylation leads to elevated mutations rates. *Nature* 395: 89-93.

Cho Y, Gorina S, Jeffrey P.D, and Pavletich N.P (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex, understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-55.

Chozick BS, Benzil DL, Stopa EG, Pezzullo JC, Knuckey NW, Epstein MH, Finkelstein SD, and Finch PW (1996). Immunohistochemical evaluation of erb-2 and p53 protein expression in benign and atypical human meningiomas. *J Neuro-Oncology* 27(2):117-26.

Cogen PH, Daneshvar L, Bowcock AM, Metzger AK, and Cavalli-Sforza LL (1991). Loss of heterozygosity for chromosome 22 DNA sequences in human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 53: 271-77.

Corn P.G, Kuerbitz S.J, van Noesel M.M, Esteller M, Compitello N, Baylin S.B, and Herman J.G (1999). Transcriptional silencing of the p73 gene in acute Lymphoblastic Leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 59: 3352-56.

Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, and Gilbert W (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274: 775-80.

Côté J, Quinn J, Workman J.L, and Peterson C.L (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265: 53-60.

Danam R.P, Qian X.C, Howell S.R, and Brent T.H (1999). Methylation of selected CpGs in the human O⁶-Methylguanine-ADN methyltransferase promoter region as a marker of gene silencing. *Molecular Carcinogenesis* 24: 85-89.

De Klein A, Riegman P.H.J., Bijlsma E, Helderdoorn A, Muijtjens M, den Bakker M.A., Avezaat Cees J.J, and Zwarthoff E.C. (1998). A G --> A transition creates a branch point sequence and activation of a cryptic exon, resulting in the hereditary disorder neurofibromatosis 2. *Hum Mol Genet* 7(3): 393-98.

De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Levrero M, and Melino G (1998). Two new p73 splice variants, γ and δ , with different transcriptional activity. *J Exp Med* 188: 1763-68.

De Laurenzi V, Catani M.V, Terrinoni A, Corrazzari M, Melino G, Costanzo A, Levrero M, and Knight R.A (1999). Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants, ϵ and ζ . *Cell Death Differ* 6: 389-90.

De Vitis L.R, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bono P, Grammtico P, Radice P, Bigozzi U, Montali E, and Papi L (1996a). Analysis of the neurofibromatosis type 2 gene in different human tumors of neuroectodermal origin. *Hum Genet* 97: 638-41.

De Vitis L.R, Tedde A, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Bigozzi U, Montali E, and Papi L (1996b). Screening for mutations in the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 97: 632-37.

De Cristofaro M.F, Betz B.L, Wang W, and Weissman B.E (1999). Alteration of hSNF5/INI1/BAF47 detected in rhabdoid cells lines and primary rhabdomyosarcomas but not Wilms' tumors. *Oncogene* 18: 7559-65.

Dezamis E and Sanson M. (2003). Génétique moléculaire des méningiomes et corrélations génotype/phénotype. *Rev Neurol (Paris)* 159 (8-9): 727-38.

Detta A, Kenny BG, Smith C, Logan A, and Hitchcock E (1993). Correlation of proto-oncogene expression and proliferation and meningiomas. *Neurosurgery* 33(6): 1065-74.

Dobrovic A and Simpfendorfer D (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 57: 3347-50.

Dong S-M, Pang J.C-S, Poon W.S, Hu J, To K-F, Chang A.R, and Ng H.K (2001). Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(8): 808-16.

Douglass E.C, Valentine M, Rowe S.T, Parham D.M, Wilimas J.A, Sanders J.M, and Houghton P.J (1990). Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotypic changes. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2: 210-16.

Dumanski J, Carlbom E, Collins P, and Nordenskjöld M (1987). Deletion mapping of a locus on human chromosome 22 involved in the oncogenesis of meningioma. *Proc Natl Acad Sci* 84: 9275-79.

Dumanski J, Rouleau G, Nordenskjöld M, and Collins P (1990). Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50: 5863-67.

Eagle L.R, Yin X, Brothman A.R, Williams B.J, Atkin N.B, and Prochownik E.V (1995). Mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Nat Genet* 9: 249-55.

Ebert C, von Haken M, Meyer-Puttlitz B, Wiestler O.D, Reifenberger G, Pietsch T, and von Deimling A (1999). Molecular Genetic Analysis of Ependymal Tumors: NF2 mutations and chromosome 22q loss occur preferentially in intramedullary spinal Ependymomas. *Am J Pathol* 155(2): 627-32.

Edwards S.D and Keep N.H (2001). The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry* 40: 7061-68.

el-Deiry WS, Nelkin B.D, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton S.R, and Baylin S.B (1991). High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci* 88: 3470-74.

Englefield P, Foulkes W.D, and Campbell I.G (1994). Loss of heterozygosity on chromosome 22 in ovarian carcinoma is distal to and is not accompanied by mutations in NF2 at 22q12. *Br J Cancer* 70: 905-907.

Esteller M, Levine R, Baylin S.B, Ellenson LH, and Herman J.G (1998). MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 17: 2413-17.

Esteller M, Hamilton S.R, Burger P.C, and Baylin S.B and Herman J.G (1999). Inactivation of the DNA repair gene O⁶-Methylguanine-ADN methyltransferase by promoter hypermethylation is a common in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59: 93-97.

Esteller M, García-Foncillas J, Andion E, Goodman SH, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB and Herman JG (2000a). Activity of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *New Engl J Med* 343: 1350-54.

Esteller M, Silva JM, and Dominguez G (2000b). Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 564-69.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB and Herman JG (2000c). Inactivation of the DNA repair gene O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60: 2368-71.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado M.A, and Baylin S.B and Herman J.G (2000d). Hypermethylation-associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60: 129-33.

Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G and Peinado MA (2001a). K-ras and p16 alterations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19: 299-304.

Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB and Herman JG (2001b). Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61: 4689-92.

Esteller M, Fraga M.F, Guo M, García-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin A.K, Trojan J, Vaurs-Barrière C, Bignon Y-J, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal M.J, Rodriguez R, Capella G, Peinado M.A, Borg A, Aaltonen L.A, Ponder B.A, and Baylin S.B and Herman J.G (2001c). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10(26): 3001-7.

Esteller M (2003). Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *The Lancet (Oncology)* 4: 351-58.

Esteller M and Herman J.G (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7.

Evans D.G, Sainio M, and Baser M.E (2000). Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet* 37: 897-904.

Evans D.G.R, Huson SM, Donnai D, Neary W.J, Blair V, Teare D, Newton V, Strachan T, Ramsden R, and Harris R (1992). A genetic study of type 2 neurofibromatosis in the United Kingdom. I. Prevalence, mutation rate, fitness, and confirmation of maternal transmission effect on severity. *J Med Genet* 29: 841-46.

Evans J.J, Jeun S-S, Lee J.H, Harwalkar J.A, Shoshan Y, Cowell J.K, and Golubic M (2001). Molecular alterations in the neurofibromatosis type 2 gene and its protein rarely occurring in meningothelial meningiomas. *J Neurosurg* 94: 111-17.

Fearon ER and Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759-67.

Findlay C.A, Hinds P.W, and Levine AJ (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-93.

Fleisher AS, Esteller M, and Wang S (1999). Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 1090-95.

Fort D, Tonk V.S, Tomlinson G.E, Timmons C.F, and Schneider N.R (1994). Rhabdoid tumour of the kidney with primitive neuroectodermal tumour of the central nervous system: associated tumours with different histologic, cytogenetic, and molecular findings. *Genes, Chromosomes & Cancer* 11: 146-52.

Friend SH, Bernards R, Rogelji S, Weinberg RA, Rapaport JM, Alberts DM, and Dryja TP (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643-46.

Gautreau A, Louvard D, and Arpin M (2002). ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Ying and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. *Curr Opin Cell Biol* 14(1): 104-09.

Gerson SL. (2002). Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J Clin Oncol* 20: 2388-99..

González-Agosti C, Xu L, Pinney D, Beauchamp R, Hobbs W, Gusella J.F, and Ramesh V (1996). The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene* 13: 1339-47.

González-Gómez P, Bello M.J, Arjona D, Lomas J, Alonso M.E, de Campos J.M, Vaquero J, Isla A, Gutierrez M, and Rey J.A (2003a). Promoter hypermethylation of multiple genes in astrocytic gliomas. *Int J Oncol* 22: 601-08.

González-Gómez P, Bello M.J, Alonso M.E, Arjona D, Lomas J, de Campos J.M, Isla A, and Rey J.A (2003b). CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *Br J Cancer* 88(1): 109-14.

González-Gómez P, Bello M.J, Alonso M.E, Lomas J, Arjona D, de Campos J.M, Vaquero J, Isla A, Lassaletta L, Gutiérrez M, Sarasa J.L, and Rey J.A (2003c). CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clin Cancer Res* 9: 5601-06.

Goutebroze L, Brault E, Muchardt Ch, Camonis J, and Thomas G (2000). Cloning and characterization of SCHIP-1, a novel protein interacting specifically with spliced isoforms and naturally occurring mutant NF2 proteins. *Mol Cell Biol* 20(5): 1699-1712.

Grand F, Kulkarni S, Chase A, Goldman J.M, Gordon M, and Cross N.C.P (1999). Frequent deletion of hSNF5/INI1, a component of the SWI/SNF complex, in chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Res* 59: 3870-74.

Griffin C.A, Hruban R.H, Long P.P, Miller N, Volz P, Carson B, and Brem H (1994). Chromosome abnormalities in meningeal neoplasms: Do they correlated with histology. *Cancer Genet Cytogenet* 78: 46-52.

Grob TJ, Novak U, Maisse C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, Hugli B, Graber HU, De Laurenzi V, Fey MF, Melino G and Tobler A (2001). Human Δ Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* 8: 1213-23.

Guan K-L, Jenkins C.W, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG and Xiong Y (1994). Growth suppression by p18, a p16^{INK4a/MTS1} and p14^{ARF/MTS2} related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes and Development* 8 (24): 2939-52.

Hamada, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, and Hakoshima T (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *The EMBO J* 19 (17): 4449-62.

Harada T, Irving RM, Xuereb JH, Barton DE, Hardy DG, Moffat DA, and Maher ER (1996). Molecular genetic investigation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor gene in sporadic meningioma. *J Neurosurg* 84: 847-51.

Hayashi K (1991). PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth Appl* 1: 34-38.

He J, Hoang-Xuan K, Marie Y, Leuraud P, Mokhtari K, Kujas M, Delattre J.Y, and Sanson M (2000). p18 tumor suppressor and progression of oligodendrogliomas to anaplasia. *Neurology* 55: 867-69.

Henn W, Cremerius U, Heide G, Lippitz B, Schroeder JM, Gilsbach JM, Bull U, and Zang K.D (1995). Monosomy 1p is correlated with enhanced in vivo glucose metabolism in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79(2): 144-48.

Herman J.G, Graff J.R, Myöhänen S, Nelkin B.D, and Baylin S.B (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 93: 9821-26.

Herman J.G, Umar A, and Polyak K (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 95: 6870-75.

Herman J.G (1999). Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol* 9: 359-67.

Hoang-Xuan K, Merel P, Vega F, Hugot J.P, Cornu P, Delattre J.Y, Poisson M, Thomas G, and Delattre O (1995). Analysis of the NF2 tumor suppressor gene and of chromosome 22 deletions in gliomas. *Int J Cancer* 60: 478-81.

Hoon Kang G, Shim Y-H, Jung H-Y, Ho Kim W, Ro J.Y, and Rhyu M-G (2001). CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 61: 2847-51.

Hsu DW, Efird JT, and Hedley-Whyte ET (1997). Progesterone and estrogens receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-20.

Hui R, MacMillan D, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JFR, and Sutherland RL (2000). INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16^{INK4a} messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6: 2777-87.

Hung G, Faudoa R, Baser M.E, Xue Z, Kluwe L, Slattery W, Brackman D, and Lim D (2000). Neurofibromatosis 2 phenotypes and germ-line NF2 mutations determined by an RNA mismatch method and loss of heterozygosity analysis in NF2 schwannomas. *Cancer Genet Cytogenet* 118: 167-68.

Husemann K, Wolter M, Büschges R, Boström J, Sabel M, and Reifenberger G (1999). Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in Oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(10): 1041- 1050.

Ishimoto O, Kawahara C, Enjo K, Obinata M, Nukiwa T and Ikawa S (2002). Possible oncogenic potential of Δ Np73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res* 62: 636-64.

Ishino S, Hashimoto N, Fushiki S, Date K, Mori T, Fujimoto M, Nakagawa Y, Ueda S, Abe T, and Inazawa J (1998). Loss of material from chromosome arm 1p during malignant progression of meningioma revealed by fluorescent *in situ* hybridization. *Cancer* 83: 360-66.

Issa J.P.J, Ottaviano Y.L, Celano P, Hamilton S.R, Davidson N.E, and Baylin S.B (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7: 536-40.

Izquierdo Rojo M (1995). Capitulo 1. In "Biología Molecular del cáncer" pp. 15-41, Ed. Síntesis, Madrid.

Jacoby L.B, MacCollin M, Louis D.N, Mohny T, Rubio M-P, Pulasky K, Troffater J.A, Kley N, Seizinger B, Ramesh V, and Gusella J.M (1994). Exon scanning for mutation of the NF2 gene in schwannomas. *Hum Mol Genet* 3(3): 413-19.

Jacoby L.B, MacCollin M, Barone R, Ramesh V, and Gusella J.F (1996). Frequency and distribution of NF2 mutations in Schwannomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 17: 45-55.

Jacoby L.B, Jones D, Davis K, Kronn D, Short P, Gusella J.M, and MacCollin M (1997). Molecular analysis of the NF2 tumor-suppressor gene in Schwannomatosis. *Am J Hum Genet* 61: 1293-1301.

Joachim T, Ram Z, Rappaport Z.H, Simon M, Schramm J, Wiestler O.D, and von Deimling A (2001). comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS, and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer* 94: 218-21.

Jones P.A (1996). DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res* 56: 2663-67.

Joseph J.T, Lisle D.K, Jacoby L.B, Paulus W, Barone R, Cohen M.L, Roggendorf W.H, Bruner J.M, Gusella J.F, and Louis D.N (1995). NF2 gene analysis distinguishes hemangiopericytoma from meningiomas. *Am J Pathol* 147: 1450-55.

Jost C.A, Marin M.C, and Kaelin W.G Jr (1997). p73 is a simian p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389: 191-194.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan J-L, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias J-M, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, and Caput D (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-19.

Kahn J, Parsa N.Z, Harada T, Meltzer P.S, and Carter N.P (1998). detection of gains and losses in 18 meningiomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 103: 95-100.

Kalamarides M, Niwa-Kawakita M, Leblois H, Abramowski V, Perricaudet M, Jannin A, Thomas G, Gutmann D.H, and Giovannini M (2002). Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningiomas development in the mouse. *Genes and Development* 16: 1060-65.

Kalpana G.V, Marmon S, Wang W, Crabtree G.R, and Goff S.P (1994). Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266: 2002-06.

Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM and Kolodner R (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57: 808-11.

Kaneko T, Yamashima T, Tohma Y, Nomura M, Imajoh-Ohmi S, Saido T.C, Nakao M, Saya H, Yamamoto H, and Yamashita J (2001). Calpain-dependent proteolysis of merlin occurs by oxidative stress in meningiomas. *Cancer* 92(10): 2662-72.

Kaufmann D, Leistner W, Kruse P, Kenner O, Hoffmeyer S, Hein Ch, Vogel W, Messiaen L, and Bartelt B (2002). Aberrant splicing in several human tumors in the tumor suppressor genes: NF1, NF2 and Tuberous sclerosis 2. *Cancer Res* 62: 1503-09.

Kepes J.J (1982). "Meningiomas. Biology, Pathology, Differential Diagnosis.," Masson, New York.

Kimura Y, Koga H, Araki N, Mugita N, Fujita N, Takeshima H, Nishi T, Yamashita T, Saido T.C, Yamasaki T, Moritake K, Saya H, and Nakao M (1998). The involvement of calpain-dependent proteolysis of the tumor suppressor NF2 (merlin) in schwannomas and meningiomas. *Nature Medicine* 4(8): 915-22.

Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, and Vahldiek F (2001). Identification of cis-acting in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes to Cells* 6: 441-54.

Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones P.A, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, and Kimchi A (1997). DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 15(4): 403-07.

Kleihues P and Cavenee W.K (2000). "Pathology and genetics of tumours of the nervous system," IARC Press, Lyon.

Kluwe L, Bayer S, Baser M.E, Hazim W, and Haase W (1996). Identification of NF2 germline mutations and comparison with neurofibromatosis 2 phenotypes. *Hum Genet* 98: 534-38.

Kluwe L, MacCollin M, Tatagiba M, Thomas S, Hazim W, Hasse W, and Mautner V-F (1998). Phenotypic variability associated with 14 splice-site mutations in the NF2 gene. *Am J Med Gen* 77: 228-33.

Knudson A.G Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 68: 820-23.

Knudson A.G (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 90:10914-21.

Koga H, Araki N, Takeshima H, Nishi T, Hirota T, Kimura Y, Nakao M, and Saya H (1998). Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene* 17: 801-10.

Kolles H, Niedermayer I, Schmitt Ch, Henn W, Feld R, Steudel W-I, Zang K.D, and Feiden W (1995). Triple approach for diagnosis and grading of meningiomas: histology, morphometry of Ki-67/Feulgen stainings, and cytogenetics. *Acta Neurochir (Wien)* 137: 174-81.

Kraus J.A, de Millas W, Sörensen N, Herbold C, Schichor C, Tonn J.C, Wiestler O.D, von Deimling A, and Pietsch T (2001). Indications for a tumor suppressor gene at 22q11 involved in the pathogenesis of ependymal tumors and distinct from hSNF5/ INI1. *Acta Neuropathol (Ber)* 102 (1): 69-74.

Kressel M and Schmucker B (2002). Nucleocytoplasmic transfer of the NF2 tumor suppressor protein merlin is regulated by exon 2 and a CRM1-dependent nuclear export signal in exon 15. *Hum Mol Genet* 11(19): 2269-78.

Kros J, de Greve K, van Tilborg A, Hop W, Pieterman H, Avezaat Cees J.J, Lekanne Deprez R.H, and Zwarthoff E.C (2001). NF2 status of meningiomas is associated with tumour localization and histology. *J Pathol* 194: 367-72.

Kwon H, Imbalzano A.N, Khavari P.A, Kingston R.E, and Green M.R (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* 370: 477-85.

Lamotte M (1984). "Estadística Biológica. Principios Fundamentales" Masson, Barcelona.

Lamszus K, Kluwe L, Matschke J, Meissner H, Laas R, and Westphal M (1999). Allelic losses at 1p, 9q, 10q, 14q, and 22q in the progression of aggressive meningiomas and undifferentiated meningeal sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 110: 103-10.

Lantos P.L, Vandenberg S.R, and Kleihues P (1996). Meningiomas. In "Tumours of the Nervous System" (Graham DI and Lantos P.L, Eds.), pp. 583-879, Arnold, London.

Lapidus R.G, Ferguson A.T, Ottaviano Y.L, Parl F.F, Smith H.S, Weitzman S.A, Baylin S.B, Issa J.P.J, and Davidson N.E (1996). Methylation of Estrogen and Progesterone gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res* 2: 805-10.

Lapidus R.G, Nass S.J, Butash K.A, Parl F.F, Weitzman S.A, Graff J.G, Herman J.G, and Davidson N.E (1998). Mapping of ER gene CpG island methylation by Methylation-specific Polymerase Chain Reaction. *Cancer Res* 58: 2515-19.

Larsen F, Gundersen G, Lopez R, and Prydz H (1992). CpG island as gene markers in the human genome. *Genomics* 13: 1095-1107.

Lasota J, Fetsch J.F, Wozniak A, Wasag B, Sciort R, and Mohny T (2001). The Neurofibromatosis type 2 gene is mutated in perineurial cell tumors. *Am J Pathol* 158(4): 1223-28.

Lee J.H, Sundaran V, Stein J, Kinney S.E, Stacey D.W, and Golubic M (1997). Reduced expression of schwannomin/merlin in human sporadic meningiomas. *Neurosurgery* 40: 578-87.

Lee WH, Shew JY, Hong F, Sery T, Donoso LA, Young LJ, Bookstein R, and Lee EYHP (1987). The retinoblastoma susceptibility gene product is a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329: 642-45.

Lekanne Deprez R.H, Groen N.A, van Biezen NA, Hagemeyer A, van Drunen E, Koper J.W, Avezaat Cees J.J, Bootsma D, and Zwarthoff E.C (1991). A t(4;22) in a meningioma points to the localization of a putative tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48: 783-90.

Lekanne Deprez R.H, Bianchi A.B, Groen N.A, Seizinger B.R, Hagemeyer A, van Drunen E, Bootsma D, Koper J.W, Avezaat Cees J.J, Kley N, and Zwarthoff E.C (1994). Frequent NF2 gene transcript mutations sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am J Hum Genet* 54: 1022-29.

Lekanne Deprez R.H, Riegman PH, van Drunen E, Warringa UL, Groen N.A, Stefanko SZ, Koper J.W, Avezaat Cees J.J, Zwarthoff E.C, y cols. (1995a). Cytogenetic, molecular genetic and pathological analyses in 126 meningiomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(2): 224-35.

Lekanne Deprez R.H, Riegman PH, Groen N.A, Warringa UL, van Biezen NA, Molijn AC, Bootsma D, de Jong PJ, Menon A.G, Kley NA, y cols. (1995b). Cloning and characterization of MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 10(8): 1521-28.

Leone P.E, Bello M.J, de Campos J.M, Vaquero J, Sarasa J.L, Pestaña A, and Rey J.A (1999). NF2 gene mutations and allelic status of 1p, 14q and 22q in sporadic meningiomas. *Oncogene* 18: 2231-2239.

Leuraud P, Marie Y, Robin E, Huguet S, He J, Mokhtari K, Cornu P, Hoang-Xuan K, and Sanson M (2000). Frequent loss of 1p32 region but no mutation of the p18 tumor suppressor gene in meningiomas. *J Neuro-Oncology* 50: 207-213.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S.I, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner S.H, Giovanella B.C, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M.H, and Parsons R (1997). PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science(Washington DC)* 275: 1943-47.

Li L-Ch, Chui R, Nakajima K, Oh B.R, Au H.C, and Dahiya R (2000). Frequent methylation of estrogen receptor in prostate cancer: correlation with tumor progression. *Cancer Res* 60: 702-06.

Li Q, Jedlicka A, Ahuja N, Gibbons M.Ch, Baylin S.B, Burger P.C, and Issa J.P.J (1998). Concordant methylation of the ER and N33 genes in glioblastoma multiforme. *Oncogene* 16: 3197-202.

Li Q, Ahuja N, Burger P.C, and Issa J.P.J (1999). Methylation and silencing of the thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18: 3284-89.

Lidblom A, Rutledge M.H, Collins V.P, Nordenskjold M, and Dumansky J.P (1994). Chromosomal deletions in anaplastic meningiomas suggest multiple regions outside chromosome 22 as important in tumor progression. *Int J Cancer* 56(3): 354-57.

Liu W, Mai M, Yozomizo A, Qian C, Tindall D.J, Smith D.I, and Thibodeau S.N (2000). Differential expression and allelotyping of the p73 gene in neuroblastoma. *Int J Oncology* 16:181-85.

Lomas J, Bello M.J, Arjona D, González-Gómez P, Alonso M.E, de Campos J.M, Kusak M.E, Gutierrez M, Isla A, and Rey J.A (2001). Analysis of the p73 in meningiomas with deletion at 1p. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 88-91.

Lomas J, Bello M.J, Alonso M.E, González-Gómez P, Arjona D, Kusak M.E, de Campos J.M, Sarasa J.L, and Rey J.A (2002). Loss of chromosome 22 and absence of *NF2* gene mutation in a case of multiple meningiomas. *Hum Pathol* 33: 375-378.

Lomas J, Amiñoso C, González-Gómez P, Alonso M.E, Arjona D, López-Marín I, de Campos J.M, Isla A, Vaquero J, Gutiérrez M, Sarasa J.L, Bello M.J, and Rey J.A (2004). Methylation status of *TP73* in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet*; en prensa.

Louis D.N, Ramesh V, and Gusella J.F (1995). Neuropathology and molecular genetics of neurofibromatosis 2 and related tumours. *Brain Pathol* 5: 163-72.

Louis D.N, Stemmer-Rachamimov A.O, and Wiestler O.D (2000a). Neurofibromatosis type 2. In "Pathology and genetics of the nervous system tumours.WHO Classification of tumors" (Kleihues P and Cavenee W.K, Eds.), pp. 176-184, IARC Press, Lyon, France.

Louis D.N, Scheithauer B.W, Budka H, von Deimling A, and Kepes J.J (2000b). Meningiomas. In "Pathology and genetics of the nervous system tumors. WHO Classification of tumors" (Kleihues P and Cavenee W.K, Eds.), pp. 176-184, IARC press, Lyon, France.

López-Gines C, Piquer J, Cerdá-Nicolás M, Barcia-Salorio J, and Barcia-Mariano C (1989). Meningiomas: Karyotypes and histological patterns. *Clin Neuropathol* 8: 130-33.

López-Gines C, Cerdá-Nicolás M, Peydró-Olaya A, and Llombart-Bosch A (1993). Case of meningioma with del(1)(p32) as sole anomaly. *Cancer Genet Cytogenet* 70: 74-76.

López-Gines C, Cerdá-Nicolás M, Barcia-Salorio JL, and LLombart-Bosch A (1995). Cytogenetical findings of recurrent meningiomas. A study of 10 tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 85(2): 113-17.

MacCollin M, Ramesh V, Jacoby L.B, Louis D.N, Rubio M-P, Pulasky K, Troffater J.A, Short M.P, Bove C, Eldridge R, Parry D.M, and Gusella J.F (1994). Mutational analysis of patients with neurofibromatosis 2. *Am J Hum Genet* 55: 314-20.

MacCollin M. NF2 Mutational map. 1996.

Internet Communication:

www.dem0nmac.mgh.harvard.edu/neurowebforum/NeurofibromatosisMenu.html

Maltby E.L, Ironside J.W, and Battersby R.D.E (1988). Cytogenetic studies in 50 meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 31: 199-210.

Manda R, Kohno T, Hamada K, Takenoshita S, Kuwano H, and Yokota J (2000). Absence of hSNF5/INI1 mutation in human lung cancer. *Cancer Letters* 153: 57-61.

Mark J, Levan G, and Mitelman F (1972). Identification by fluorescence of the G chromosome lost in human meningiomas. *Hereditas* 71: 163-68.

Maxwell M, Galonopoulos T, Hedley-Whyte ET, Black P.McL, and Antoniades HN (1990). Human meningiomas co-express platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF-receptor genes and their protein products. *Int J Cancer* 46(1): 16-21.

Maxwell M, Galonopoulos T, Golden J, and Antoniades HN (1993). Expression of androgen and progesterone receptors in primary human meningiomas. *J Neurosurg* 78: 456-62.

Medema RH, Herrera RE, Lam F, and Harlow RA (1995). Growth suppression by p16 INK4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci* 92: 6289-93.

Meese E, Blin N, and Zang K.D (1987). Loss of heterozygosity and the origin of meningioma. *Hum Genet* 77(4): 349-51.

Melino G, de Laurenzi V, and Vousden K.H (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nature Reviews* 2: 1-8.

Mendiola M, Bello M.J, Alonso J, Leone P.E, Vaquero J, Sarasa J.L, Kusak M.E, de Campos J.M, Pestaña A, and Rey J.A (1999). Search for mutations of the hRAD54 gene in sporadic meningiomas with deletion at 1p32. *Molecular Carcinogenesis* 24: 300-04.

Menon A.G, Rutter J.L, von Sattel J.P, Synder H, Murdoch C, Blumenfeld A, Martuza R.L, von Deimling A, Gusella J.F, and Houseal T.W (1997). Frequent loss of chromosome 14 in atypical and malignant meningioma: identification of a putative "tumor progression" locus. *Oncogene* 14: 611-16.

Mérel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Moreau-Aubry A, Bijlsma E.K, Lazaro C, Moisan J.P, Resche F, Nishisho I, Estivill X, Delattre J.Y, Poisson M, Theillet C, Hulsebos T.J.M, Delattre O, and Thomas G (1995a). Predominant occurrence of somatic mutations of the NF2 gene in meningiomas and schwannomas. *Genes, Chromosomes & Cancer* 13: 211-16.

Mérel P, Hoang-Xuan K, Sanson M, Bijlsma E, Rouleau G, Laurent-Puig P, Pulst S, Baser M.E, Lenoir G, Sterkers J.M, Philippon J, Resche F, Mautner V-F, Fischer G, Hulsebos T.J.M, Aurias A, Delattre O, and Thomas G (1995b). Screening for Germ-Line Mutations in the NF2 Gene. *Genes, Chromosomes & Cancer* 12: 117-27.

Mihaila D, Gutierrez J.A, Rosenblum ML, Newsham I.F, Böglér O, and Rempel S.A (2003a). Meningiomas: analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in tumor progression and the delineation of four regions of chromosomal deletion in common with other cancers. *Clin Cancer Res* 9: 4435-42.

Mihaila D, Jankowski M, Gutierrez J.A, Rosenblum ML, Newsham I.F, Böglér O, and Rempel S.A (2003b). Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res* 9: 4443-51.

Mohyuddin A, Neary W.J, Wallace A, Wu C.L, Purcell S, Reid H, Ramsden R.T, Read A, Black G, and Farrell W.E (2002). Molecular genetic analysis of the NF2 gene in young patients with unilateral vestibular schwannomas. *J Med Genet* 39: 315-22.

Muchardt C, Sardet C, Bourachot B, Onufryk C, and Yaniv M (1995). A human protein with homology to *Saccharomyces cerevisiae* SNF5 interacts with the potential helicase hbrm. *Nucleic Acid Res* 23: 1127-32.

Muñoz A (1997). "Cáncer. Genes y nuevas terapias.," Hélice, Madrid.

Murakami M, Hashimoto N, Takahashi Y, Hosokawa Y, Inazawa J, and Mineura K (2003). A consistent region of deletion on 1p36 in meningiomas: identification and relation to malignant progression. *Cancer Genet Cytogenet* 140: 99-106.

Müller P, Henn W, Niedermayer I, Ketter R, Feiden W, Steudel W-I, Zang K.D, and Steilen-Gimbel H (1999). Deletion of chromosome 1p and loss of expression of Alkaline Phosphatase indicate progression of meningiomas. *Clin Cancer Res* 5: 3569-77.

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (2001). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C ---> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 22(10): 1715-19.

Ng H.K, Lau K.M, Tse J.Y.M, Lo K.W, Wong J.H.C, Poon W.S, and Huang D.P (1995). Combined molecular genetic studies of chromosome 22q and the Neurofibromatosis type 2 gene in central Nervous system tumors. *Neurosurgery* 37(4): 764-73.

Nomoto S, Haruki N, Kondo M, Konishi H, Takahashi Ta, Takahashi To, and Takahashi Takashi (1998). Search for mutations and examination of allelic expression imbalance of the p73 gene at 1p36.33 in human lung cancers. *Cancer Res* 58: 1380-83.

Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H, Hamou MF, Diserens AC, Shinohe Y, Sawamura Y, Iwasaki Y, de Tribolet N, and Hegi ME (2001). p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade. *Brain Pathol* 11(3): 296-305.

O'Doherty AM, Church SW, Russell SEH, Nelson J, and Hickey I (2002). Methylation status of oestrogen receptor- α gene promoter sequences in human ovarian epithelial cell lines. *Br J Cancer* 86: 282-84.

Obremski V.J, Hall A.M, and Fernandez-Valle C (1998). Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* 37: 487-501.

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, and Hayashi K (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-79.

Papi L, de Vitis L.R, Vitelli F, Ammannati F, Mennonna P, Montali E, and Bigozzi U (1995). Somatic mutations in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic meningiomas. *Hum Genet* 95: 347-51.

Parry D.M, MacCollin M, Kaiser-Kupfer MI, Pulasky K, Nicholson HS, Bolesta M, Eldridge R, and Gusella J.F (1996). Germ-line mutations in the neurofibromatosis 2 gene: correlations with disease severity and retinal abnormalities. *Am J Hum Genet* 59: 529-39.

Pearson M.A, Reczek D, Bretscher A, and Karplus A (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101: 259-70.

Perry A, Jenkins RB, Dahl RJ, Moertel CA, and Scheithauer B.W (1996). Cytogenetic analysis of aggressive meningiomas: possible diagnostic and prognostic implications. *Cancer* 77(12): 2567-73.

Peyrard M, Fransson I, Xie Y-G, Han Fei-yu, Ruttledge M.H, Swahn S, Collins J.E, Dunham I, Collins P, and Dumanski J (1994). Characterization of new member of the human beta-adaptin gene family chromosome 22q12, a candidate meningioma gene. *Hum Mol Genet* 3(8): 1393-99.

Pieper R.O, Patel S, Ting S.A, Futscher B.W, and Costello J.F (1996). Methylation of CpG island transcription factor binding sites is unnecessary for aberrant silencing of the human MGMT gene. *J Biol Chem* 271(23): 13916-24.

Poulsgard L, Ronne M, and Schroeder H.D.D.A (1989). Cytogenetic studies in 19 meningiomas and their clinical significance. *Anticancer Res* 9: 109-12.

Poulsgard L, Schroeder H.D.D.A, and Ronne M (1990). Cytogenetic studies of 11 meningiomas and their clinical significance. *Anticancer Res* 10: 535-38.

Razin A (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing a three-way connection. *EMBO J* 17(17): 4905-08.

Rempel S.A, Schwechheimer K, Davis RL, Cavenee WK, and Roseblum ML (1993). Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningiomas progression. *Cancer Res* 53: 2386-93.

Rey J.A, Bello M.J, de Campos J.M, Kusak M.E, and Moreno S (1988). Chromosomal Involvement secondary to -22 in human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 33: 275-90.

Rey J.A, Bello M.J, Jimenez-Lara A.M, Vaquero J, Kusak M.E, de Campos J.M, Sarasa J.L, and Pestaña A (1992). Loss of heterozygosity for distal markers on 22q in human gliomas. *Int J Cancer* 51: 703-706.

Rey J.A, Bello M.J, de Campos J.M, Vaquero J, Kusak M.E, Sarasa J.L, and Pestaña A (1993). Abnormalities of chromosome 22 in human brain tumors determined by combined cytogenetic and molecular genetic approaches. *Cancer Genet Cytogenet* 66: 1-10.

Roberts DD (1996). Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J* 10: 1183-91.

Robertson KD and Jones P.A (1998). The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol* 18: 6457-73.

Rouleau G, Merel P, Lutchman M, Sanson M, Zucman J, Marineau C, Hoang-Xuan K, Demczuk S, Desmaze Ch, Plougastel B, Pulst S, Lenoir G, Bijlsma E, Fashold R, Dumanski J, de Jong P, Parry D, Eldridge R, Aurias A, Delattre O, and Thomas G (1993). Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neurofibromatosis type 2. *Nature* 363: 515-21.

Rubio M-P, Correa KM, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby L.B, von Deimling A, Gusella J.F, and Louis D.N (1994). Analysis of the neurofibromatosis 2 gene in human ependymomas and astrocytomas. *Cancer Res* 54: 45-47.

Russel D.S and Rubinstein L.J (1989). In "Pathology of the tumors of the Nervous system" pp. 449-505, Edward Arnold, London.

Ruttledge M.H, Xie Y-G, Han Fei-yu, and et al. (1994). Deletions on chromosome 22 in sporadic meningioma. *Genes, Chromosomes & Cancer* 10: 122-30.

Ruttledge M.H, Andermann A.A, Phelan C.M, Claudio J.O, Han Fei-yu, Chretien N, Rangaratnam S, MacCollin M, Short P, Parry D, Michels V, Riccardi V.M, Weksweg R, Kitamura K, Bradburn J.M, Hall B.D, Propping P, and Rouleau G (1996). Type of mutation in the Neurofibromatosis type 2 gene (NF2) frequently determines severity of disease. *Am J Hum Genet* 59: 331-42.

Sainio M, Zhao F, Heiska L, Turunen O, den Bakker M.A., Zwarthoff E.C, Lutchman M, Rouleau G, Jääskeläinen J, Vaheri A, and Carpén O (1997). Neurofibromatosis 2 tumor suppressor protein colocalizes with ezrin and CD44 and associates with actin-containing cytoskeleton. *J Cell Sci* 10: 2249-60.

Sainz J, Huynh D.P, Figueroa K, Ragge N.K, Baser M.E, and Pulst S (1994). Mutations of the neurofibromatosis type 2 gene and lack of the gene product in vestibular schwannomas. *Hum Mol Genet* 3(6): 885-91.

Sainz J, Figueroa K, Baser M.E, Mautner V-F, and Pulst S (1995). High frequency of nonsense mutations in the NF2 gene caused by C to T transitions in five CGA codons. *Hum Mol Genet* 4(1):137-39.

Sambrook J, Fritsch E.F, and Maniatis T (1989). "Molecular Cloning: Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, N Y.

Sanson M, Richard S, Delattre O, Poliwka M, Mikol J, Philippon J, and Thomas G (1992). Allelic loss on chromosome 22 and histopathological predictors of recurrence in meningioma. *Int J Cancer* 50: 391-94.

Santarius T, Kirsch M, Nikas D.C, Imitola J, and Boström J (2000). Molecular analysis of alterations of the p18/ INK4c gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26: 67-75.

Schmitz U, Mueller W, Weber M, Sévenet N, Delattre O, and von Deimling A (2001). INI1 mutations in meningiomas at a potential hotspot in exon 9. *Br J Cancer* 84(2):199-201.

Schneider BF, Shashi V, von Kap-herr C, and Golden W.L (1995). Loss of chromosomes 22 and 14 in the malignant progression of meningiomas. a comparative study of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and standard cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 85(2): 101-04.

Scoles D.R, Baser M.E, and Pulst S.M. (1996). A missense mutation in the neurofibromatosis 2 gene occurs in patients with mild and severe phenotypes. *Neurology* 47: 544-46.

Scoles D.R, Huynh D.P, Morcos P.A., Coulsell E.R., Robinson N.G.G., Tamanoi F, and Pulst S.M. (1998). Neurofibromatosis 2 Tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nature Genetics* 18: 354-59.

Seizinger B.R, de la Monte S, Atkins L, Gusella J.F, and Martuza R.L (1987). Molecular genetic approach to human meningiomas: Loss of genes n chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5419-23.

Sekido Y, Pass H.I, Bader S, Mew D.J.Y, Christman M.F, Gazdar A.F, and Minna J.D (1995). Neurofibromatosis type 2 gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 55: 1227-31.

Sévenet N, Lellouch-Tubiana A, Schofield D, Hoang-Xuan K, Gessler M, Birnbaum D, Jeanpierre C, Jouvet A, and Delattre O (1999a). Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 8(13): 2359-68.

Sévenet N, Sheridan E, Amram D, Schneider P, Handgretinger R, and Delattre O (1999b). Constitutional mutations of the hSNF5/INI1 gene predispose to a variety of cancers. *Am J Hum Genet* 65: 1342-48.

Shashi V, Lovell M.A, von Kap-herr C, Waldron P, and Golden W.L (1994). Malignant rhabdoid tumour of the kidney: involvement of chromosome 22. *Genes, Chromosomes & Cancer* 10: 49-54.

Shaw RJ, McClatchey AI, and Jacks T (1998). Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem* 273(13): 7757-64.

Shaw RJ, Paez JG, Curto M, Yaktine A, Pruitt WM, Saotome I, O'Bryan JP, Gupta V, Ratner N, Der CJ, Jacks T, and McClatchey AI (2001). The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell* 1(1): 63-72.

Shimizu T, Seto A, Maita N, Hamada K, Tsukita Sh, Tsukita S, and Hakoshima T (2002). Structural basis for Neurofibromatosis type 2. *J Biol Chem* 277(12):10332-36.

Shu J, Lee J.H, Harwalkar J.A, Oh-Siskovic S, Stacey D.W, and Golubic M (1999). Adenovirus-mediated gene transfer of dominant negative Ha-Ras inhibits proliferation of primary meningiomas cells. *Neurosurgery* 44(3): 579-88.

Simon M, von Deimling A, Larson J.J, Wellenreuther R, Kaskel P, Waha A, Warnick R.E, Tew J.M, and Menon A.G (1995). Allelic losses on chromosomes 14, 10 and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res* 55: 4696-701.

Simpson D.J, Hibberts N.A, McNicol A.M, Clayton R.N, and Farrell W.E (2000). Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Res* 60: 1211-16.

Simpson D.J, Frost SJ, Bicknell JE, Broome JC, McNicol A.M, Clayton R.N, and Farrell W.E (2001). Aberrant expression of G(1) / S regulators is a frequent event in sporadic pituitary adenomas. *Carcinogenesis* 22(8): 1149-54.

Steck P.A, Pershouse M.A, Jasser S.A, Yung W.K.A, Lin H, Ligon A.H, Langford L.A, Baumgard M.L, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng D.H.F, and Tavtigian S.V (1997). Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-62.

Stokowski R.P and Cox D.R (2000). Functional analysis of the Neurofibromatosis type 2 protein by means of disease-causing point mutations. *Am J Hum Genet* 66: 873-91.

Sulman E.P, Dumansky J.P, White P.S, Zhao H, Maris JM, Mathiesen T, Bruder C, Cnaan A and Brodeur GM (1998). Identification of a consistent region of allelic loss on 1p32 in meningiomas: correlation with increased morbidity. *Cancer Res* 58: 3226-30.

Takahashi H, Ichimiya S, Nimura Y, Watanabe M, Furusato M, Wakui S, Yatani R, Aizawa S, and Nakagawara A (1998). Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res* 58: 2076-77.

Takehima H, Izawa I, Lee PS, Safdar N, Levin VA, and Saya H (1994). Detection of cellular proteins that interact with the NF2 tumor suppressor gene product. *Oncogene* 9(8): 2135-44.

Troffater J.A, MacCollin M, Rutter J.L, Murrell J.R, Duyao M.P, Parry D, Eldridge R, Kley N, Menon A.G, Pulasky K, Haase V.H, Ambrose C.M, Munroe D, Bove C, Haines J.L, Martuza R.L, MacDonald M.E, Seizinger B.R, Short M.P, Buckler A.J, and Gusella J.F (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72: 791-800.

Tse J.Y.M, Ng H.K, Lau K.M, Lo K.W, Poon W.S, and Huang D.P (1997). Loss of heterozygosity of chromosome 14q in low and high-grade meningiomas. *Hum Pathology* 28(7): 779-85.

Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, and Shimotohno K (1999). New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* 18: 4993-98.

Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, and Shimotohno K (2001). Transcriptional activities of p73 splicing variants are regulated by inter-variant association. *Biochem J* 356: 859-66.

Ueki K, Wen.Bin Ch, Narita Y, Asai A, and Kirino T (1999). Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59: 5995-98.

Vagner-Capodano AM, Grisoli F, Gambarelli D, Sedan R, Pellet W, and De Victor B (1993). Correlation between cytogenetic and histological findings in 75 human meningiomas. *Neurosurgery* 32(6): 892-900.

Versteeg R, Caron H, Cheng N.C, van der Drift P, Slater R, Westerveld A, Voute P.A, Delattre O, Laureys G, van Roy N, and Speleman F (1995). 1p36: Every sub band a suppressor? *European J Cancer* 31A: 538-41.

Versteeg I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck M.F, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, and Delattre O (1998). Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394: 203-06.

Versteeg I, Medjkane S, Rouillard D, and Delattre O (2002). A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene* 21(42): 6403-12.

Walpone R.E and Myers R.H (1992). "Probabilidad y estadística" Mc Graw-Hill, México D.F.

Wang J.L, Zhang Z.J, Hartman M, Smits A, Westermarck B, Muhr C, and Nistér M (1995). Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polimerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embeded samples. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 64: 223-28.

Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns B.R, and Crabtree G.R (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes and Development* 10: 2117-30.

Wang Y, Krushel L.A, and Edelman G.M (1996). Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci* 93: 3932-36.

Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, and Ohgaki H (2001). Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(12): 1181-89.

Weber R.G, Boström J, Wolter M, Baudis M, Collins P, Reifenberger G, and Lichter P (1997). Analysis of genomic alteration in benign, atypical, and anaplastic meningiomas: toward a genetic model of meningiomas progression. *Proc Natl Acad Sci* 94:14719-24.

Wellenreuther R, Kraus J.A, Lenartz D, Menon A.G, Schramm J, Louis D.N, Ramesh V, Gusella J.F, Wiestler O.D, and von Deimling A (1995). Analysis of the NF2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am J Pathol* 146(4): 827-32.

Wellenreuther R, Waha A, Vogel Y, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD and von Deimling A (1997). Quantitative analysis of neurofibromatosis type 2 gene transcripts in meningiomas supports the concept of distinct molecular variants. *Lab Invest* 77: 601-06.

White M.B, Calvalho M, Derse D, O'Brien S.J, and Dean M (1992). Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 12: 301-06.

Wolter M, Reifenberger J, Blaschke B, Ichimura K, Schmidt E.E, Collins V.P, and Reifenberger G (2001). Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16^{INK4a}), p14^{ARF}, and CDKN2B (MTS2, p15^{INK4b}) tumor suppressor genes. *J Neuropathol Exp Neurol* 60(12): 1170-80.

Wong I.H.N, Lo Y.M.D, Zhang J, Liew Ch-T, Ng M.H.L, Wong N, Lai P.B.S, Lau W.Y, Hjelm M, and Johnson P.J (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res* 59: 71-73.

Xing E.P, Nie Y, Song Y, Yang G-Y, Cai Y.Ch, Wang L.D, and Yang Ch.S (1999). Mechanisms of inactivation of p14^{ARF}, p15^{INK4b}, and p16^{INK4a} genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 5: 2704-13.

Xu H.M and Gutmann D.H (1998). Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 51: 403-15.

Yin D, Xie D, Hoffmann W-K, Miller CW, Black K.L, and Koeffler H.P (2002). Methylation, expression, and mutation analysis of the cell cycle control genes in human brain tumors. *Oncogene* 21: 8372-78.

Yin D, Xie D, Hoffmann W-K, Zhang W, Asotra K, Wong R, Black K.L, and Koeffler H.P (2003). DNA repair Gene O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase: promoter hypermethylation associated with decreased expression and G:C to A:T mutations of p53 in brain tumors. *Molecular Carcinogenesis* 36: 23-31.

Yoshikawa H, Nagashima M, Khan MA, McMenamin MG, Hagiwara K, and Harris CC (1999). Mutational analysis of p73 and p53 in human cancer cell lines. *Oncogene* 18(22): 3415-21.

Yuge M, Nagai T, Uchida T, Murate T, Hayashi Y, Hotta T, Saito H, and Kinoshita T (2000). hSNF5/INI1 gene mutations in lymphoid malignancy. *Cancer Genet Cytogenet* 122: 37-42.

Zang K.D (1982). Cytological and cytogenetical studies on human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 6: 249-74.

Zankl H and Zang K.D (1972). Cytological and cytogenetical studies on brain tumors. IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as N° 22 by fluorescence technique. *Hum Genet* 14: 167-69.

Zhao JF and Sharma S (1995). Expression of the ROS1 oncogene for tyrosine receptor kinase in adult human meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 83(2): 148-54.

Zöchbauer-Müller S, Fong K.M, Virmani A.K, Geradts J, Gazdar A.F, and Minna J.D (2001). Aberrant promoter methylation of multiples genes in non-small lung cancers. *Cancer Res* 61: 249-255.