



Original

## Patrones de hipermetilación génica en tumores ginecológicos

Pamela Leal Rojas, Leonardo Anabalón Rodríguez, Patricia García Muñoz, Oscar Tapia Escalona, Pablo Guzmán González, Juan Carlos Araya Orostica, Miguel Villaseca Hernández y Juan Carlos Roa Strauch\*

Departamento de Anatomía Patológica, Laboratorio de Patología Molecular, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 17 de diciembre de 2007

Aceptado el 15 de mayo de 2008

On-line el 9 de marzo de 2009

#### Palabras clave:

Metilación del ácido desoxirribonucleico

Tumores ginecológicos

Región promotora

### RESUMEN

**Fundamento y objetivo:** El silenciamiento génico mediado por la metilación aberrante de la región promotora del ácido desoxirribonucleico está implicado en la inactivación de genes involucrados en diversas vías metabólicas y se ha constituido en un marcador molecular útil en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de sujetos oncológicos. El objetivo de este trabajo es analizar los patrones de hipermetilación génica en mujeres con tumores ginecológicos.

**Sujetos y método:** Se seleccionaron 115 mujeres con cánceres ginecológicos: 22 mujeres con cáncer de ovario (CO), 13 mujeres con cáncer de endometrio (CE), 11 mujeres con cáncer de cuello uterino y 69 mujeres con cáncer de mama. Mediante prueba de metilación específica por reacción en cadena de la polimerasa, se estudió el estado de metilación de los genes *CDNK2A* (*p16*), *APC1A*, *FHIT*, *CDH1* y *hMLH1*.

**Resultados:** Las frecuencias de metilación génica para los genes *CDNK2A* (*p16*), *APC1A*, *FHIT*, *CDH1* y *hMLH1* fueron del 29,2; 34; 60,4; 10,9, y 79,8%, respectivamente. El 70% de los casos presentó al menos 2 genes metilados, es decir, un índice de metilación superior a 0,4. La frecuencia de metilación más baja se observó en el CO, mientras que la frecuencia de metilación más alta se presentó en el CE.

**Conclusiones:** Los resultados indican que la metilación aberrante de la región promotora es un acontecimiento importante en la carcinogénesis de los tumores ginecológicos y que el patrón de metilación génica se asocia a la naturaleza tumoral. Estas características particulares pueden entregar información relevante acerca de las principales vías metabólicas alteradas en cada tipo tumoral, información que sumada a estudios complementarios de pérdida de expresión o de función representa una herramienta clínica para el tratamiento adecuado de la enfermedad.

© 2007 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Promoter Hypermethylation gene patterns in gynecological tumors

### ABSTRACT

**Background and objective:** Gene silencing mediated by the aberrant methylation of the promoter region of DNA is involved in the inactivation of genes implicated in various metabolic pathways. Such a gene hypermethylation has become a useful molecular marker for the diagnosis, treatment and follow-up of cancer patients. Our objective is to analyze the patterns of gene hypermethylation in patients with gynecological tumors.

**Patients and methods:** We selected 115 patients with gynecological cancers: 22 ovarian; 13 endometrial, 11 cervical-uterine and 69 breast cancers. By testing methylation-specific PCR, we studied the methylation status of genes *CDNK2A* (*p16*), *APC1A*, *FHIT*, *CDH1* and *hMLH1*.

**Results:** The frequencies of gene methylation in genes *p16*, *APC1A*, *FHIT*, *hMLH1* and *CDH1* were 29.2%, 34%, 60.4%, 10.9% and 79.8%, respectively. 70% of cases showed at least two methylated genes, which means a rate of methylation >0.4. The lowest frequency of methylation was seen in ovarian cancer, while the highest one was observed in endometrial cancer.

**Conclusions:** The results indicate that the aberrant methylation of the promoter region is an important event in carcinogenesis of gynecological tumors and that the pattern of gene methylation is associated with the nature of the tumor. These particular characteristics can deliver relevant information on the major metabolic pathways altered in each tumor type. In addition to complementary studies (ie, loss of expression and/or function), this represents a clinical tool for the proper management of the disease.

© 2007 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

DNA Methylation

Gynecological tumor

Promoter region

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jcroa@ufro.cl (J.C. Roa Strauch).

## Introducción

Dentro de los cánceres ginecológicos, los tipos más frecuentes son el cáncer de mama (CM), el cáncer de cuello uterino (CCU), el cáncer de endometrio (CE) y el cáncer de ovario (CO)<sup>1</sup>. De éstos, el CM es la tercera causa de muerte por cáncer en las mujeres y la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres mayores de 50 años, con una tasa de mortalidad general de 13 cada 100.000 mujeres<sup>2</sup>. El CCU es la cuarta causa de muerte por cáncer en las mujeres chilenas: presenta una tasa de mortalidad de 8,3 cada 100.000 mujeres<sup>3</sup>. Mientras que el CE es una neoplasia más frecuente en países desarrollados: presenta una incidencia de 12 cada 100.000 mujeres a los 40 años y aumenta a 84 cada 100.000 mujeres a los 60 años<sup>4</sup>. En Chile no hay información sobre su incidencia; sin embargo, presenta una mortalidad de 1,5 cada 100.000 habitantes, con 170 muertes por año<sup>2</sup>. El CO es la sexta causa más común de neoplasia y la quinta causa de muerte por cáncer; es de difícil tratamiento debido a que frecuentemente su diagnóstico se hace en etapas avanzadas de la enfermedad<sup>5</sup>.

La metilación aberrante de los islotes CpG en la región promotora de genes se ha asociado a la inactivación transcripcional de genes supresores de tumores en variados tipos de cáncer<sup>6</sup>. Esta alteración molecular se produce por la incorporación de un grupo metilo en la posición 5' del anillo de la citosina en dinucleótidos CpG mediante una reacción que catalizan las enzimas ADN-metiltransferasas<sup>7</sup>. Sin embargo, de todas las modificaciones epigenéticas, la hipermetilación, que reprime la transcripción de la región promotora de genes supresores de tumores y ocasiona el silenciamiento génico, ha sido la más estudiada. Este silenciamiento génico puede afectar a genes de diversas vías metabólicas, como la regulación del ciclo celular (genes *p16INK4a*, *p15INK4a*, *Rb* y *p14ARF*)<sup>8</sup>, la reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) (genes *hMLH1* y *hMSH2*)<sup>9,10</sup>, la supresión de tumores (genes *p16*, *FHIT* y *APC*)<sup>11</sup>, la apoptosis (genes *DAPK* y *TMS1*)<sup>12</sup>, la resistencia a fármacos, la detoxificación (gen *GSTP1*)<sup>13</sup>, la diferenciación, la adherencia celular (gen *E-cadherin*)<sup>14</sup>, la angiogénesis y la metástasis. Estos cambios epigenéticos son acontecimientos tempranos en la carcinogénesis y se encuentran presentes en lesiones precursoras de una gran variedad de cánceres, incluidos los tumores ginecológicos<sup>15</sup>. Las investigaciones recientes demuestran que distintos tipos tumorales presentan variados patrones de metilación. Las principales áreas de aplicación clínica que se ven beneficiadas con los marcadores basados en patrones de metilación aberrante son la detección, el comportamiento y el tratamiento del tumor.

En este trabajo se estudia el estatus de metilación de los genes *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*), *CDKN2A* (*p16*), *APC* (*Adenomatous Poliposis Coli*), *hMLH1* (*Human Mut Homologue 1*) y *CDH1* (*E-cadherin*) en cánceres ginecológicos, así como la frecuencia de hipermetilación y la asociación a características clinicopatológicas. Estos genes se seleccionaron por su importancia en la carcinogénesis en humanos y porque se presentan frecuentemente metilados en otros tipos de tumores como parte de las principales vías metabólicas asociadas a cáncer: proliferación celular, inestabilidad microsatelital, adherencia celular y metástasis. Por tanto, si se determinan los patrones de hipermetilación para cada forma o tipo de cáncer ginecológico, se aporta una valiosa información clínica para la monitorización, el tratamiento y el seguimiento de estos sujetos.

## Sujetos y método

### Sujetos

Para este estudio se seleccionaron 115 mujeres con cánceres ginecológicos; las muestras se obtuvieron entre los años 1999 y 2005: 22 mujeres con CO, 13 mujeres con CE, 11 mujeres con CCU

y 69 mujeres con CM. Las muestras provinieron del banco de tumores del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La Frontera. Todas las muestras se mantuvieron en gel criopreservante (Jung, Alemania) a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para la obtención del material se seleccionó un área tumoral mediante corte de congelación y se fragmentó en cámara fría.

### Extracción de ácido desoxirribonucleico

La extracción de ADN se realizó según el procedimiento adaptado del protocolo de aislamiento de ADN genómico Puregene (Gentra, EE. UU.). Para esto, los fragmentos de tejido se incubaron a  $65^{\circ}\text{C}$  en microtubos de 1,5 ml con solución de lisis celular y proteinasa K (10 mg/ml) hasta observar lisis tisular total. Las proteínas se eliminaron a través de precipitación en acetato de amonio de 7,5 M. El ADN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 70%, luego se resuspendió en solución de hidratación y finalmente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Prueba de metilación específica mediante reacción en cadena de la polimerasa

#### Modificación con bisulfito

El principio de la modificación de ADN con la técnica de bisulfito de sodio se basa en su capacidad de convertir a todos los residuos de citosina no metilada en uracilos mediante deaminación; sin embargo, cuando la citosina está metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina. Los iniciadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizados aprovechan estas diferencias para discriminar entre frecuencias metiladas y frecuencias no metiladas. Se utilizó un protocolo previamente descrito por Herman et al en 1996. Para esto, se desnaturalizaron 2  $\mu\text{g}$  de ADN incubados a  $75^{\circ}\text{C}$  durante 15 min en un volumen de 22  $\mu\text{l}$  con hidróxido de sodio (NaOH) y con una concentración final de 0,27 N. Se agregó hidroquinona y bisulfito de sodio con pH 5,0 preparados en fresco, en concentraciones finales de 50  $\mu\text{M}$  y de 4,2 M, respectivamente; luego se realizó una incubación a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. El ADN modificado se purificó y se concentró usando tubos Centricon YM 30 (Millipore). La desulfonación se llevó a cabo agregando NaOH a una concentración final de 0,3 N e incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. Después de neutralizar la solución con acetato de amonio, se precipitó durante toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  con 3 volúmenes de etanol en presencia de glucógeno. Finalmente, se resuspendió en 80  $\mu\text{l}$  de agua desionizada.

### Amplificación del ácido desoxirribonucleico

Las secuencias de iniciadores de la PCR y las condiciones específicas se realizaron de acuerdo con Roa et al (2006)<sup>16</sup>. Las PCR se realizaron con 100 ng de ADN genómico modificado; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada iniciador; 200  $\mu\text{M}$  de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos; 1,5 mM de cloruro de magnesio, y 0,75 U de Taq polimerasa (Promega) en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Como control negativo se utilizaron 100 ng de ADN genómico sin modificar y un blanco de mezcla de reacción sin ADN. Para el control positivo de metilación se utilizó ADN genómico comercial (Promega) metilado con Sssl (Biolab), mientras que como control positivo de ADN no metilado se utilizó el mismo ADN modificado sin metilar.

Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en tampón TBE y en gel de agarosa al 2% en tampón TAE, teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó el índice de metilación como un indicador de la proporción de regiones promotoras metiladas respecto a la totalidad de los genes

estudiados y se calculó dividiendo el número de genes metilados por el número de genes analizados.

### Análisis estadístico

La relación entre el estado de metilación génica con variables categóricas, tales como sexo, raza y tipo histológico, se estableció mediante la prueba de la  $\chi^2$  o la prueba exacta de Fisher. Para variables numéricas, como la edad, se utilizó el test de la t de Student.

### Resultados

#### Características clínicas

Las características generales del grupo estudiado se observan en la tabla 1. Se presentó una edad promedio de 58 años (con extremos de 35 y 85 años). La supervivencia global a los 5 años fue del 67%, y se obtuvo un intervalo de seguimiento de 4 a 95 meses para el grupo analizado, con un promedio de 53,3 meses de supervivencia. La estadificación según el sistema TNM (tumor, adenopatía, metástasis) concentró la mayoría de los casos en los estadios I y II (38,6 y 35,1%, respectivamente); los estadios III y IV presentaron frecuencias del 24,8 y del 1,4%, respectivamente. En relación con el grado de diferenciación del tumor, se encontró un 33,1% para el grado 1, un 42,9% para el grado 2, y un 20,9% para el grado 3.

#### Estado de metilación génica

Las frecuencias de metilación de las áreas promotoras de los 5 genes estudiados para los 115 casos de tumores ginecológicos se presentan en la tabla 2. Los porcentajes de metilación fluctuaron

**Tabla 1**  
Características generales y morfológicas del grupo de estudio (n = 115)

Característica	Endometrio	Ovario	Cuello uterino	Mama
Edad (años)				
Promedio	63,4	59,2	50,8	58,6
Extremos	49-86	31-88	30-76	29-88
Etnia				
Mapuche	8%	32%	0%	10%
No mapuche	92%	68%	100%	90%
Seguimiento (meses)				
Promedio	32,4	17,8	108,8	54,4
Rango	6-84	1-108	4-158	6-29
Metástasis ganglionar				
Positivo	14%	8%	67%	56%
Negativo	86%	92%	33%	44%
Grado de diferenciación				
Bien	46%	50%	18%	18,5%
Moderado	39%	25%	64%	55,7%
Poco	15%	25%	18%	25,8%
TNM				
I	38,5%	72,7%	27,3%	15,9%
II	30,8%	18,2%	36,4%	55,1%
III	30,8%	4,5%	36,4%	27,5%
IV	0%	4,5%	0%	1,4%

TNM: tumor, adenopatía, metástasis.

entre el 10,9 (gen *hMLH1*) y el 79,8% (gen *CDH1*). Los genes *p16* y *APC1A* presentaron frecuencias de metilación similares (del 29,2 y del 34%, respectivamente), mientras que el gen *FHIT* se encontró metilado en el 60,4% de los casos. Sin embargo, al analizar cada tumor se observaron algunas diferencias en el estado de metilación de los genes (tabla 4). Por ejemplo, en el CE se observó el porcentaje de metilación más alto (53,9%), mientras que en el CO se observó una frecuencia de metilación promedio del 24,6%. En los CCU y CM se presentaron porcentajes de metilación similares, cercanos al 47%. Al analizar la frecuencia de metilación por gen, se observó que *CDH1* se encontraba metilado en el 100% de los casos analizados de CCU, mientras que *hMLH1* no presentaba metilación (tabla 2). Para los genes *p16* y *APC*, la mayor frecuencia de metilación se presenta en el CM, con un 40,6 y un 53,6%, respectivamente, mientras que para los genes *FHIT* y *hMLH1* el mayor porcentaje de metilación se observó en el CE.

#### Índice de metilación

El índice de metilación es un indicador que muestra la proporción de áreas promotoras metiladas respecto a los genes estudiados y se calcula dividiendo el número de genes metilados por el número de genes estudiados. Los resultados se observan en la tabla 3. La distribución de los datos fue homogénea en cada categoría, excepto en el CM. En resumen, el 73,4% de los casos presentó más de 2 genes metilados, es decir, un índice de metilación de 0,4 o superior.

#### Datos clinicopatológicos y metilación

Al realizar el análisis estadístico del estado y del índice de metilación de los genes con los datos clinicopatológicos de las mujeres, no se observó un efecto estadísticamente significativo en el CO, el CE ni el CCU. Sin embargo, en el CM se observó una mayor supervivencia cuando *p16* se encontraba metilado ( $p = 0,002$ ), una menor diferenciación tumoral cuando *CDH1* presentaba metilación ( $p = 0,007$ ) y una menor frecuencia de metilación para *hMLH1* en mujeres de raza mapuche ( $p = 0,03$ ). Finalmente, aquellos tumores con metilación del gen *APC* presentaron un mayor tamaño tumoral y una menor diferenciación (menos de 0,05). Para el gen *FHIT* se observó una tendencia no significativa a

**Tabla 2**  
Frecuencia de metilación de la región promotora de genes asociados al cáncer en los tumores ginecológicos estudiados

Tumor (n)	<i>p16</i> (%)	<i>APC1A</i> (%)	<i>FHIT</i> (%)	<i>hMLH1</i> (%)	<i>CDH1</i> (%)	Total (%)
Endometrio (13)	30,8	46,2	84,6	23,1	84,6	53,9
Ovario (22)	9,1	9,1	31,8	9,1	63,6	24,6
Cuello uterino (11)	36,4	27,3	81,8	0,0	100,0	49,1
Mama (69)	40,6	53,6	43,5	11,6	71,0	44,1
Promedio	29,2	34,0	60,4	10,9	79,8	42,8

**Tabla 3**  
Índice de metilación por localización tumoral

Índice de metilación	Endometrio n (%)	Ovario n (%)	Cuello uterino n (%)	Mama n (%)	Total n (%)
0	0	5 (22,7)	0	8 (11,6)	13 (8,6)
0,2	0	8 (36,4)	2 (18,2)	12 (17,4)	20 (18,0)
0,4	7 (53,8)	8 (36,4)	3 (27,3)	21 (30,4)	38 (37,0)
0,6	3 (23,1)	1 (4,5%)	5 (45,5)	15 (21,7)	24 (23,7)
0,8	3 (23,1)	0	1 (9,1)	12 (17,4)	16 (12,4)
1	0	0	0	1 (1,4)	1 (0,4)

**Tabla 4**  
Estatus de metilación de la región promotora de genes asociados al cáncer en tumores ginecológicos

Caso	Edad	Material	p16	APC1A	FHIT	hMLH1	CDH1	Índice de metilación
CE1	67	ENDOMETRIO	M	NM	M	NM	M	0,6
CE2	56	ENDOMETRIO	M	NM	M	NM	NM	0,4
CE3	62	ENDOMETRIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CE4	61	ENDOMETRIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CE5	62	ENDOMETRIO	NM	M	NM	NM	M	0,4
CE6	60	ENDOMETRIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CE7	67	ENDOMETRIO	NM	M	NM	M	M	0,6
CE8	61	ENDOMETRIO	NM	M	M	M	M	0,8
CE9	52	ENDOMETRIO	NM	NM	NM	NM	NM	0,4
CE10	86	ENDOMETRIO	M	NM	M	NM	M	0,6
CE11	72	ENDOMETRIO	NM	M	M	M	M	0,8
CE12	49	ENDOMETRIO	NM	M	M	NM	NM	0,4
CE13	71	ENDOMETRIO	M	M	M	NM	M	0,8
CO1	54	OVARIO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CO2	56	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO3	68	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO4	38	OVARIO	NM	NM	M	NM	NM	0,2
CO5	88	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO6	71	OVARIO	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CO7	31	OVARIO	NM	NM	NM	NM	NM	0
CO8	65	OVARIO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CO9	73	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO10	60	OVARIO	M	M	NM	NM	M	0,6
CO11	49	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO12	66	OVARIO	NM	NM	NM	M	M	0,4
CO13	58	OVARIO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CO14	50	OVARIO	NM	NM	NM	NM	NM	0
CO15	69	OVARIO	NM	NM	NM	NM	NM	0
CO16	44	OVARIO	NM	NM	NM	M	M	0,4
CO17	64	OVARIO	NM	NM	NM	NM	NM	0
CO18	58	OVARIO	M	NM	NM	NM	NM	0,2
CO19	48	OVARIO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CO20	61	OVARIO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CO21	52	OVARIO	NM	NM	NM	NM	NM	0
CO22	80	OVARIO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CU1	33	ÚTERO	M	NM	M	NM	M	0,6
CU2	53	ÚTERO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CU3	51	ÚTERO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CU4	46	ÚTERO	M	M	M	NM	M	0,8
CU5	63	ÚTERO	NM		M	NM	M	0,4
CU6	35	ÚTERO	NM	M	M	NM	M	0,6
CU7	30	ÚTERO	NM	M	M	NM	M	0,6
CU8	43	ÚTERO	NM	NM	M	NM	M	0,4
CU9	76	ÚTERO	M	NM	M	NM	M	0,6
CU10	59	ÚTERO	M	NM	M	NM	M	0,6
CU11	70	ÚTERO	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CM1	38	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM2	48	MAMA	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CM3	41	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM4	44	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM5	46	MAMA	M	NM	NM	NM	M	0,4
CM6	29	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM7	49	MAMA	M	NM	NM	NM	M	0,4
CM8	42	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM9	41	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM10	45	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM11	42	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM12	33	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM13	34	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM14	38	MAMA	M	NM	NM	NM	M	0,4
CM15	43	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM16	46	MAMA	NM	M	M	NM	M	0,6
CM17	47	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM18	49	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM19	46	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM20	47	MAMA	M	M	M	M	M	1
CM21	43	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM22	57	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM23	54	MAMA	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CM24	57	MAMA	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CM25	50	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM26	57	MAMA	NM	NM	M	NM	NM	0,2
CM27	56	MAMA	NM	M	NM	M	NM	0,4
CM28	52	MAMA	NM	M	NM	NM	M	0,4
CM29	50	MAMA	M	NM	M	M	NM	0,6

Tabla 4 (continuación)

Caso	Edad	Material	p16	APC1A	FHIT	hMLH1	CDH1	Índice de metilación
CM30	57	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM31	59	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM32	57	MAMA	M	M	NM	M	M	0,8
CM33	54	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM34	50	MAMA	NM	M	M	M	M	0,8
CM35	53	MAMA	M	M	NM	M	M	0,8
CM36	65	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM37	60	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM38	67	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM39	69	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM40	66	MAMA	NM	NM	NM	NM	M	0,2
CM41	68	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM42	64	MAMA	NM	NM	M	NM	NM	0,2
CM43	60	MAMA	NM	M	M	NM	NM	0,4
CM44	65	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM45	62	MAMA	M	NM	NM	NM	M	0,4
CM46	61	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM47	64	MAMA	M	NM		NM	M	0,4
CM48	68	MAMA	M	NM	M	NM	M	0,6
CM49	68	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM50	64	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM51	60	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM52	66	MAMA	NM	M	M	M	M	0,8
CM53	67	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM54	75	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM55	79	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM56	72	MAMA	NM	NM	NM	NM	NM	0
CM57	75	MAMA	NM	M	M	NM	NM	0,4
CM58	73	MAMA	NM	NM	M	NM	M	0,4
CM59	70	MAMA	NM	M	M	NM	M	0,6
CM60	78	MAMA	M	NM	M	NM	M	0,6
CM61	79	MAMA	M	NM	M	NM	M	0,6
CM62	70	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM63	71	MAMA	M	NM	M	NM	M	0,6
CM64	76	MAMA	M	NM	M	NM	M	0,6
CM65	70	MAMA	M	M	M	NM	M	0,8
CM66	82	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM67	81	MAMA	NM	M	NM	NM	NM	0,2
CM68	88	MAMA	M	M	NM	NM	M	0,6
CM69	87	MAMA	NM	M	NM	M	M	0,6

CCU: Cáncer de cuello uterino; CE: Cáncer de endometrio; CM: Cáncer de mama; CO: Cáncer de ovario.

NM, no metilado.

M, metilado.

estar metilado en ausencia de receptores de estrógeno y progesterona (menos de 0,05).

## Discusión

Costello et al describieron inicialmente la existencia de patrones específicos de hipermetilación en islotos CpG para cada cáncer humano (2000)<sup>17</sup>; luego, Esteller et al la confirmaron (2001)<sup>18</sup>. En el presente estudio se evaluó el estado de metilación de 5 genes en tumores ginecológicos. Los genes escogidos participan en distintas vías celulares y su desregulación está implicada en el inicio y la progresión de diversos cánceres<sup>19</sup>. De acuerdo con el análisis de los resultados, el gen *CDH1* presenta una frecuencia de metilación alta (superior al 60%) en los 4 tipos tumorales. Este gen codifica una proteína de membrana (E-cadherin), cuya principal función es la preservación de la integridad epitelial a través del mantenimiento de la adherencia intercelular y de la polaridad celular<sup>14</sup>. La disfunción de la E-cadherin se asocia al desarrollo de tumores de alto grado, invasión y metástasis en múltiples neoplasias<sup>20</sup>. La inactivación del gen *CDH1* puede ser consecuencia de mutaciones germinales (como se ha descrito para los carcinomas gástricos de tipo difuso en familias con predisposición)<sup>21</sup>, o bien debido a mutaciones somáticas (como se ha demostrado para el carcinoma lobular de

mama y para el cáncer gástrico de tipo difuso; más del 50% de estos cánceres presenta mutaciones somáticas en ambos alelos del gen). Sin embargo, para la mayoría de los cánceres que presentan una disminución o pérdida de expresión de *E-cadherina*, las mutaciones no son comunes y se ha demostrado que acontecimientos epigenéticos, como hipermetilación de promotores y cambios en la estructura de la cromatina, son un mecanismo de inactivación de uno o ambos alelos del gen<sup>22</sup>. En el caso de los tumores ginecológicos, los estudios que evalúan la inactivación de este gen han demostrado que la metilación de su promotor es un acontecimiento frecuente en los 4 carcinomas<sup>10</sup>. En el CCU se han descrito frecuencias que varían del 43,3 al 80,6% en distintas series de casos<sup>12,23</sup>. Además, se ha detectado metilación del gen en muestras de suero de sujetos con cáncer de cuello uterino y se ha determinado que el estado metilado del gen se correlaciona significativamente con una peor supervivencia de las mujeres. En el CE, la hipermetilación de *CDH1* se ha asociado a la dediferenciación y a la capacidad invasiva del tumor<sup>24</sup>. Igualmente, en mujeres con cáncer ovárico invasivo es más frecuente la metilación de este gen. Yuecheng et al (2006)<sup>25</sup> describieron que el estado metilado de *CDH1* se correlaciona con la pérdida de expresión inmunohistoquímica y que, a su vez, ambos sucesos se asocian a metástasis en nódulos linfáticos y a grado de diferenciación tumoral; de este modo, son indicadores pronósticos útiles para esta neoplasia.

En el caso del gen *hMLH1*, se observó una mayor frecuencia de metilación en el CE y ausencia de estado metilado en los casos de CCU. En tumores ováricos, la frecuencia de metilación de este gen no superó el 10%. Estos resultados concuerdan con los publicados para otras series de casos, en los que se ha observado que la metilación de este gen reparador está más asociada a tumores endometriales que al CO y al cáncer de cuello uterino<sup>19,26</sup>. En este estudio, la frecuencia de metilación alcanzó el 20% en carcinomas de endometrio. Otros estudios han encontrado entre un 13 y un 40% de metilación del gen *hMLH1* en esta neoplasia<sup>27,28</sup>. Uno de los principales mecanismos de inactivación de este gen reparador es la hipermetilación aberrante de su promotor y la pérdida de función contribuye al desarrollo de inestabilidad microsatelital en varios tumores. Esta característica se ha utilizado como marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer de colon<sup>29</sup>, de CO<sup>30</sup> y de CE<sup>31</sup>. Sin embargo, en el carcinoma de células renales esporádico se ha mostrado que la metilación del promotor del gen *hMLH1* no está implicada en la patogénesis<sup>10</sup>.

Al analizar el estado de metilación del gen *FHIT*, los resultados de este trabajo indican que la metilación de su promotor es un acontecimiento frecuente en los cánceres asociados al útero (más del 80%). Los cánceres ováricos también presentaron metilación de este gen, aunque la frecuencia no superó el 32%. Asimismo, se observó metilación de los genes *CDNK2A* y *APC1A* en los 4 tipos de cánceres, aunque en tumores ováricos se observó una menor frecuencia de metilación en ambos genes. Los resultados de metilación de estos 2 genes en el CE (30,8 y 46%, respectivamente) son similares a los publicados por Yang et al en 2006<sup>19</sup>, que alcanzaron porcentajes que fluctuaron entre el 25 y el 35%. En el cáncer de cuello uterino, se detectó un mayor porcentaje de metilación de *p16* (36,4%) que el descrito para otras series de casos (25%).

Si se consideran la implicancia de la metilación aberrante en la génesis y la progresión de diversas neoplasias, los resultados obtenidos indican que este acontecimiento participa en la carcinogénesis de los tumores ginecológicos estudiados. Por otra parte, según la naturaleza tumoral, el patrón de metilación génica presenta diferencias notables en genes como *hMLH1* y *FHIT*. Además, los resultados muestran que, según la localización del tumor, la evolución de las curvas del índice de metilación requiere diferentes perfiles de activación.

Estas características particulares pueden entregar información relevante acerca de las principales vías metabólicas alteradas en cada tipo tumoral, información que sumada a estudios complementarios de pérdida de expresión o función, representan una herramienta clínica para el tratamiento adecuado de la enfermedad.

## Bibliografía

- Benedet JL. Progress in gynecologic cancer detection and treatment. International Journal of Gynaecology and Obstetrics: the Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. 2000;70:135-47.
- Medina E, Kaempffer AM. Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. Revista Médica de Chile. 2001;129:1195-202.
- Suarez E, Prieto M. Cervical cancer: the Chilean perspective. FIGO 6th annual report on the results of treatment in gynecological cancer. International Journal of Gynaecology and Obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. 2006;95(Suppl 1):S235-8.
- Fujita M. Biology of endometrial cancer. Nippon Rinsho. 2004;62(Suppl 10):264-8.
- Jara L, Ampuero S, Santibanez E, Seccia L, Rodriguez J, Bustamante M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2006;166:36-45.
- Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. The Journal of Pathology. 2002;196:1-7.
- Esteller M. Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2003;532:39-49.
- Martini M, Ciccarone M, Garganese G, Maggiore C, Evangelista A, Rahimi S, et al. Possible involvement of hMLH1, p16 (INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. International Journal of Cancer. 2002;102:398-406.
- Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2005;45:629-56.
- Salinas-Sanchez AS, Rubio-del-Campo A, Sanchez-Sanchez F, Gimenez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ, Garcia-Olmo DC, et al. Promoter hypermethylation status of the mismatch repair gene hMLH1 in patients with sporadic renal cell carcinoma. Med Clin (Barc). 2006;126:452-4.
- Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. Ann Surg. 2001;234:10-20.
- Jeong DH, Youm MY, Kim YN, Lee KB, Sung MS, Yoon HK, et al. Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. Int J Gynecol Cancer. 2006;16:1234-40.
- Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Principe M, Scintu M, Apicella A, et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. Clin Cancer Res. 2004;10:5349-54.
- Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. BMC Cancer. 2006;6:48.
- Wiley A, Katsaros D, Chen H, Rigault de la Longrais IA, Beeghly A, Puopolo M, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. Cancer. 2006;107:299-308.
- Roa JC, Anabalón L, Roa I, Melo A, Araya JC, Tapia O, et al. Promoter methylation profile in gallbladder cancer. Journal of Gastroenterology. 2006;41:269-75.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. Nature Genetics. 2000;24:132-8.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. Cancer Research. 2001;61:3225-9.
- Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. BMC Cancer. 2006;6:212.
- Yoshida H, Alattia JR, Ikura M. Molecular mechanism of cadherin-mediated cell-cell adhesion. Seikagaku. 2002;74:1266-71.
- Stone J, Bevan S, Cunningham D, Hill A, Rahman N, Peto J, et al. Low frequency of germline E-cadherin mutations in familial and nonfamilial gastric cancer. British Journal of Cancer. 1999;79:1935-7.
- Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Research. 1995;55:5195-9.
- Feng Q, Balasubramanian A, Hawes SE, Toure P, Sow PS, Dem A, et al. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. Journal of the National Cancer Institute. 2005;97:273-82.
- Saito T, Nishimura M, Yamasaki H, Kudo R. Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma. Cancer. 2003;97:1002-9.
- Yuecheng Y, Hongmei L, Xiaoyan X. Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. Clinical & Experimental Metastasis. 2006;23:65-74.
- Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Chan KY, Tsang PC, Khoo US, et al. Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. Gynecologic Oncology. 2004;93:435-40.
- Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. Clin Cancer Res. 2000;6:3607-13.
- Banno K, Yanokura M, Susumu N, Kawaguchi M, Hirao N, Hirasawa A, et al. Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer. Oncology Reports. 2006;16:1189-96.
- Sincrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. Gastroenterology. 2006;131:729-37.
- Dellas A, Puhl A, Schraml P, Thomke SE, Ruschoff J, Mihatsch MJ, et al. Molecular and clinicopathological analysis of ovarian carcinomas with and without microsatellite instability. Anticancer Research. 2004;24:361-9.
- Honore LH, Hanson J, Andrew SE. Microsatellite instability in endometrioid endometrial carcinoma: correlation with clinically relevant pathologic variables. Int J Gynecol Cancer. 2006;16:1386-92.