

Estudio del patrón de metilación génico en el cáncer gástrico en Chile

Juan Carlos Roa S, Leonardo Anabalón R, Iván Roa E, Oscar Tapia E, Angélica Melo, Miguel Villaseca H, Juan Carlos Araya O.

Promoter methylation profile in gastric cancer

Background: Promoter genomic DNA methylation is an important inactivation mechanism of tumor suppressor genes. This genetic-molecular pathway for cancer may separate a subset of patients with different prognoses and eventually different responses to specific therapies. **Aim:** To analyze the methylation pattern of important genes related to different carcinogenic mechanisms in patients with gastric cancer (GC) and the relationship with its morphological features and biological behavior. **Material and methods:** Forty-seven fresh-frozen GC samples were selected. The methylation-specific PCR (MSP) test was used to analyze promoter methylation status for genes MLH1, CDKN2A (p16), APC, CDH1 (Cadherin E) and FHIT. Follow-up and complete morphological features were obtained for all cases. **Results:** We found methylation in at least one of the genes studied in 83% of the cases. The frequencies of promoter hypermethylation of MLH1, CDKN2A, APC, CDH1 and FHIT were 31%, 43%, 46%, 80% y 62%, respectively. We found a relationship between APC methylation and good histological differentiation ($p=0.03$); CDH1 methylation with diffuse type by Lauren and 3 or more metastatic lymph nodes ($p < 0.05$); FHIT, CDKN2A and CDH1 methylation and female condition ($p < 0.04$). We also found a non-significant relationship between CDKN2A methylation and better survival ($p=0.07$). **Conclusions:** The high frequency promoter methylation found confirms its importance in gastric carcinogenesis. The finding of alterations in the methylation pattern of genes studied and its association with prognostic factors is a helpful tool in the search for new criteria in clinical and therapeutic decision making (Rev Méd Chile 2005; 133: 874-80).

(Key Words: DNA methylation; Promoter regions (Genetics); Stomach neoplasms)

Recibido el 29 de noviembre, 2004. Aceptado el 26 de abril, 2005.

Trabajo financiado en parte por Proyectos de la Dirección de Investigación de la Universidad de la Frontera (DIUFRO) 120537 y 140213.

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

Correspondencia a: Dr. Juan Carlos Roa. Departamento de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de La Frontera. Manuel Montt 112. Código Postal 478-1176. Temuco, Chile. E-mail: jcroa@ufro.cl

El cáncer gástrico es la neoplasia maligna más frecuente en la población chilena y es la primera causa de muerte por tumores malignos, con una tasa de mortalidad general de 18 por 100.000 habitantes^{1,2}. Aun cuando existe una tendencia mundial y nacional en la disminución de la frecuencia del cáncer gástrico, esta neoplasia seguiría siendo la más frecuente durante las próximas décadas en nuestro país².

La carcinogénesis gástrica es un fenómeno multifactorial que involucra una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas. Estas últimas corresponden a alteraciones en la función génica sin modificación de la secuencia nucleotídica del ADN. La metilación del ADN es el cambio epigenético más frecuente e importante hasta ahora estudiado en tumores en humanos, incidiendo directamente en la inactivación de los genes supresores de tumores, genes reguladores del ciclo celular, genes reparadores del ADN y aquellos involucrados en la invasión y metástasis. Ocurre normalmente en vertebrados y está involucrada en la regulación transcripcional de genes en el período de embriogénesis y en la inactivación del cromosoma X³.

En las células tumorales existe un estado de hipometilación del ADN genómico, pero de hipermetilación en regiones ricas en citocinas y guaninas (islotos CpG), cuya longitud varía entre las 500 y 2.000 pb y que están ubicadas frecuentemente cerca o dentro de las áreas promotoras génicas, en aproximadamente la mitad de los genes humanos conocidos⁴⁻⁶. La hipermetilación de estas áreas produce represión transcripcional debido a un cambio en la estructura de la cromatina, que la hace inaccesible a los factores de transcripción, pudiendo de esta manera inactivar a los genes involucrados en las distintas vías carcinogénicas. Este fenómeno se ha reportado en varios tipos de tumores, lo que ha permitido establecer patrones específicos de metilación en subgrupos de tumores⁷⁻¹².

Nuestro objetivo fue examinar el patrón de metilación de la región promotora de genes involucrados en distintas vías carcinogénicas de carcinomas gástricos avanzados y relacionarlos con características demográficas y morfológicas asociadas con pronósticos diferentes.

Se seleccionaron los genes supresores de tumores relacionados con el ciclo celular FHIT

(*Fragile Histidine Triad*), CDKN2A (p16) y APC (*Adenomatous Poliposis Coli*), el gen MLH1 (*Human Mut Homologue 1*) probablemente el más importante de los genes reparadores de ADN genómico, relacionado con inestabilidad microsatelital y el gen CDH1 (Caderina E), que codifica una proteína de transmembrana que participa en el complejo de moléculas de adhesión involucradas en la metástasis e invasión tumoral¹³.

MATERIAL Y MÉTODO

Pacientes: Se seleccionaron 47 muestras procedentes de pacientes gastrectomizados por cáncer gástrico avanzado, del Banco de Tumores del Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de La Frontera. Todas las muestras fueron mantenidas en gel criopreservante (Jung, Alemania) a -70°C . Para la obtención del material, se seleccionó un área tumoral mediante corte de congelación y se fragmentó en cámara fría. En todos los pacientes se obtuvo seguimiento completo y las características clínicas de la serie se obtuvieron desde las fichas clínicas. Para la clasificación morfológica de los tumores se utilizaron los criterios de la OMS, Lauren y Nakamura.

El criterio de selección de los genes estudiados, se basó básicamente en la incidencia de éstos en las distintas vías carcinogénicas de tumores digestivos en humanos¹⁴.

Extracción del ADN: Se realizó según protocolo del *kit* de aislamiento de ADN genómico Puregene (GENTRA, USA). Brevemente, los fragmentos de tejido se incubaron a 65°C en tubos Eppendorf de 1,5 ml con solución de lisis celular y proteinasa K (10 mg/ml) hasta observar lisis tisular total. Las proteínas fueron eliminadas por precipitación en acetato de amonio 7,5 M pH 7,5. El ADN fue precipitado con isopropanol, lavado con etanol 70%, resuspendido en solución de hidratación (buffer TE pH 8,0) y almacenado a -20°C .

Prueba de metilación específica mediante PCR (MSP). 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 (C) no metiladas en uracilos (U) mediante deaminación;

la citosina metilada es resistente a la reacción y permanece como citosina¹⁵. Los iniciadores de PCR utilizados aprovechan estas diferencias para discriminar entre aquellas secuencias metiladas y no metiladas. Se usó protocolo previamente descrito¹⁵. Brevemente, 2 µg de ADN fueron desnaturalizados incubando a 75°C por 15 min en un volumen de 22 µl con NaOH (concentración final 0,27 N). Se agregó hidroquinona y bisulfito de sodio pH 5,0 preparados en fresco, a concentraciones finales de 50 µM y 4,2 M respectivamente, seguido de una incubación a 50°C durante 16 h. El ADN modificado fue purificado y concentrado usando tubos Centricon YM 30 (Millipore, Bedford MA). La desulfonación se llevó a cabo agregando NaOH a una concentración final de 0,3 N e incubando a 37°C durante 15 min. Después de neutralizar la solución con acetato de amonio, se precipitó durante toda la noche a -20°C con 3 volúmenes de etanol en presencia de glicógeno. Finalmente, se resuspendió en 80 µl de agua deionizada.

Amplificación del ADN: Las secuencias de partidores y condiciones de PCR han sido previamente descritas¹⁶. Las reacciones fueron realizadas con aproximadamente 100 ng de ADN genómico modificado, 0,2 µM de cada iniciador, 200 µM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfatos, 1,5 mM de MgCl y 0,75 U de Taq Polimerasa (Promega) en un volumen final de 25 µl. Se usó como control negativo 100 ng de ADN genómico sin modificar. Como control positivo de metilación se utilizó ADN genómico comercial (Promega) metilado con SssI (Biolab) y como control negativo, ADN genómico (Promega) no metilado modificado.

Los productos de PCR, fueron visualizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en buffer TBE y de agarosa al 2% en buffer TAE, teñidos con bromuro de etidio.

Se utilizó el índice de metilación como un indicador de la proporción de regiones promotoras metiladas respecto de la totalidad de los genes estudiados y se calcula dividiendo el número de genes metilados por el número de genes analizados.

Para el análisis estadístico se utilizaron las pruebas de Chi cuadrado, t de Student, Kaplan Meier y Fisher.

RESULTADOS

Características clínicas. Las características generales del grupo estudiado se observan en la Tabla 1. Este fue mayoritariamente de sexo masculino (73%) y no mapuche (92%). La serie presentó una edad promedio de 62,9 años. La sobrevida en promedio fue de 39,6 meses, con rango de 1 a 108 meses. Por otra parte, los pacientes menores de 50 años en general presentaron una peor sobrevida ($p < 0,05$).

Según la clasificación TNM, la mayoría de los casos se concentró en las etapas II y III (35% y 48%, respectivamente). En relación al grado de diferenciación, la mayoría correspondió a tumores poco y moderadamente diferenciados (61% y 33%, respectivamente). El tipo histológico más frecuente fue el tubular (71%) y el menos frecuente el papilar (6%).

Estado de metilación génica. Las frecuencias de metilación de la región promotora de los genes estudiados en los 47 casos de tumores de estómago analizados (Tabla 2), fluctuaron entre 31% para MLH1 y 80% para CDH1. Los genes p16 y APC presentaron frecuencias de metilación similares (43% y 46%, respectivamente), mientras que el gene FHIT estuvo metilado en el 62% de los casos.

Encontramos que la metilación de la región promotora de los genes p16, FHIT y CDH1 fue más frecuente en mujeres ($p=0,02$, $p=0,04$ y $p=0,04$, respectivamente) (Tabla 1). En relación al grado de diferenciación del tumor, se observó que el gen p16 presentó una alta frecuencia de metilación en tumores poco diferenciados ($p < 0,05$), mientras que la metilación del gen APC se relacionó con tumores bien diferenciados ($p=0,03$). En el caso del gen CDH1, la metilación de su región promotora se asoció a tumores indiferenciados de acuerdo a la clasificación de Nakamura ($p < 0,05$). Se observó también que este gen estuvo frecuentemente metilado en aquellos casos que presentaron 3 o más ganglios positivos ($p < 0,05$).

Sobrevida y metilación: No se encontró relación entre la sobrevida de los pacientes con el patrón de metilación de los genes analizados, salvo el gen CDKN2A que al estar metilado, mostró una tenden-

Tabla 1. Características generales y morfológicas del grupo estudiado (n=47)

Sexo	Femenino 27% (13)	Masculino 73% (34)	1
Edad (años)	Promedio 62,9	Rango 35 a 91	
Etnia	No mapuche 8% (4)	Mapuche 92% (43)	
Seguimiento (meses)	Promedio 39,6	Rango 1-108	
Tamaño tumoral	Promedio		
T1	T2	T3	
6% (2)	46% (22)	48% (23)	
Grado diferenciación			
Bien	Moderado	Poco	2
6% (2)	33% (16)	61% (29)	
Tipo histológico	A Sello	23% (11)	
	Papilar	6% (3)	
	Tubular	71% (33)	
Nivel de infiltración	Mucosa	2% (1)	
	Submucosa	4% (2)	
	M propia	8% (4)	
	Subserosa	40% (19)	
	Serosa	46% (21)	
Estadio TNM	I	15% (7)	
	II	35% (16)	
	III	48% (23)	
	IV	2% (1)	
Ganglios positivos	Si	No	
	77% (36)	23% (11)	
Ganglios positivos ≥3	Si	No	3
	63% (30)	37% (17)	
Tipo de tratamiento	Curativo	15% (7)	
	Parcialmente curativo	23% (11)	
	No curativo	62% (29)	

¹ p16, FHIT y CDH1 metilación más frecuente en mujeres (p=0,02), (p=0,04) y (p=0,04), respectivamente.

² APC1A metilación más frecuente asociada a tumores bien diferenciados (p=0,03).

³ CDH1 metilado más frecuente asociado a GG ≥3 (p <0,05).

Tabla 2. Frecuencia de metilación del área promotora (n=47)

	Positivo	Negativo
p16	20 (43%)	27 (57%)
HMLH1	15 (31%)	32 (69%)
APC1A	21 (46%)	26 (54%)
CDH1	38 (80%)	9 (20%)
FHIT	29 (62%)	18 (38%)

cia a dar una mejor sobrevida en aquellos pacientes que presentaron metilado este gen (p=0,07).

El índice de metilación se resume en la Tabla 3. El 70% de los casos presentaron más de 2 genes metilados es decir un índice de metilación de 0,4 o superior.

No encontramos relación entre el patrón de metilación de los genes analizados y la raza de los pacientes.

Tabla 3. Índice de metilación

Índice de metilación	%	(n)
0	13%	(6)
0,2	17%	(8)
0,4	15%	(7)
0,6	33%	(15)
0,8	10%	(5)
1	12%	(6)

DISCUSIÓN

En el presente trabajo analizamos el perfil de metilación de 5 genes, todos ellos relacionados con distintas vías carcinogénicas alteradas en tumores digestivos en humanos. La prueba aplicada en este estudio: metilación específica mediante PCR, detecta hasta 0,1% de ADN metilado, constituyéndose en una técnica altamente sensible que permite pesquisar este fenómeno en las primeras etapas del desarrollo carcinogénico¹⁵.

Observamos una alta frecuencia de metilación en 4 de 5 genes estudiados (>40%), sólo el gen hMLH1 mostró una menor frecuencia de metilación (31%). Este gen es el más importante de la familia de los genes reparadores de ADN y su inactivación es responsable del aumento de mutaciones observado en un grupo de tumores, condición conocida como inestabilidad microsatelital¹⁷ y que en el caso de cánceres gástricos alcanza al 11,7% de nuestra población¹⁸. La frecuencia de metilación del área promotora de este gen es superior a la encontrada en carcinomas gástricos con estabilidad microsatelital y más baja frente al 89% de metilación encontrada en carcinomas gástricos con un alto grado de inestabilidad microsatelital^{18,19}. Esto debido probablemente a que nuestro grupo de estudio corresponde a una mezcla de subgrupos de tumores con alto grado de inestabilidad microsatelital con otros de bajo grado y otro grupo sin inestabilidad microsatelital.

En el análisis del gen APC observamos metilación en 46% de los casos. Este valor es levemente más alto que el obtenido en una serie de 38 tumores gástricos estudiados por MSP, donde se encontró 31% de metilación del área promotora²⁰.

Sin embargo, otro estudio mostró una frecuencia de metilación del área promotora en adenocarcinomas esófago-gástricos, cercana al 80%²¹.

Nuestros casos presentaron 43% de metilación para el gen CDKN2A, asociándose a tumores poco diferenciados y a pacientes de sexo femenino. ($p < 0,05$ y $p = 0,02$ respectivamente), además observamos una tendencia a tener una mejor supervivencia en pacientes que presentaron metilado este gen, sin embargo no fue estadísticamente significativa ($p = 0,07$). Diferentes series han comunicado frecuencias de metilación entre 25% y 67%^{20,22,23}, sugiriendo además su participación en etapas tempranas de la carcinogénesis²³.

Hasta donde conocemos, no existe información de metilación de FHIT en cánceres gástricos; sin embargo, la expresión inmunohistoquímica se ha descrito considerablemente reducida en el 38,2% en carcinomas y en 12,5% de los adenomas sugiriendo su participación en etapas tempranas de la carcinogénesis gástrica²⁴. Esta pérdida de expresión inmunohistoquímica se ha asociado a peor pronóstico²⁵ y a cánceres de tipo difuso, poco diferenciados²⁶. En nuestra serie, la frecuencia de metilación del gen FHIT, fue de 62% de positividad y mostró ser más frecuente en pacientes de sexo femenino ($p = 0,04$).

Nuestra serie mostró una alta frecuencia de metilación para el gen CDH1, alcanzando a 80% de los casos analizados. Esta cifra es considerablemente más alta que el 54% de metilación comunicado en una serie de pacientes con cáncer gástrico difuso²⁷. Sin embargo, es similar a otra serie que comunicó frecuencias de metilación del gen CDH1 de 78,3%, 80% y 90% para displasias, cáncer gástrico incipiente y cáncer gástrico avanzado, respectivamente²⁸. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas de metilación de CDH1 con tumores difusos ($p = 0,03$) e indiferenciados ($p < 0,05$), según la clasificación de Lauren y Nakamura, respectivamente. Además encontramos que este gen se presentó más frecuentemente metilado en pacientes de sexo femenino ($p = 0,04$), y en pacientes con 3 o más metástasis ganglionares linfáticas ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observó relación con el pronóstico de la enfermedad.

El índice de metilación en 70% de los casos estudiados fue superior o igual a 0,4 es decir presentaban a lo menos 2 genes metilados. Esto

demuestra la frecuente participación de la metilación de áreas promotoras génicas en la carcinogénesis gástrica, las cuales además se asocian a algunas características demográficas de los pacientes y características morfológicas tumorales que se asocian a peor pronóstico.

El estudio del patrón de metilación como vía de inactivación epigenética en lesiones preneoplásicas gástricas y carcinomas incipientes, permitirá una mejor comprensión acerca de los factores ambientales que juegan un rol en la carcinogénesis gástrica de nuestra población.

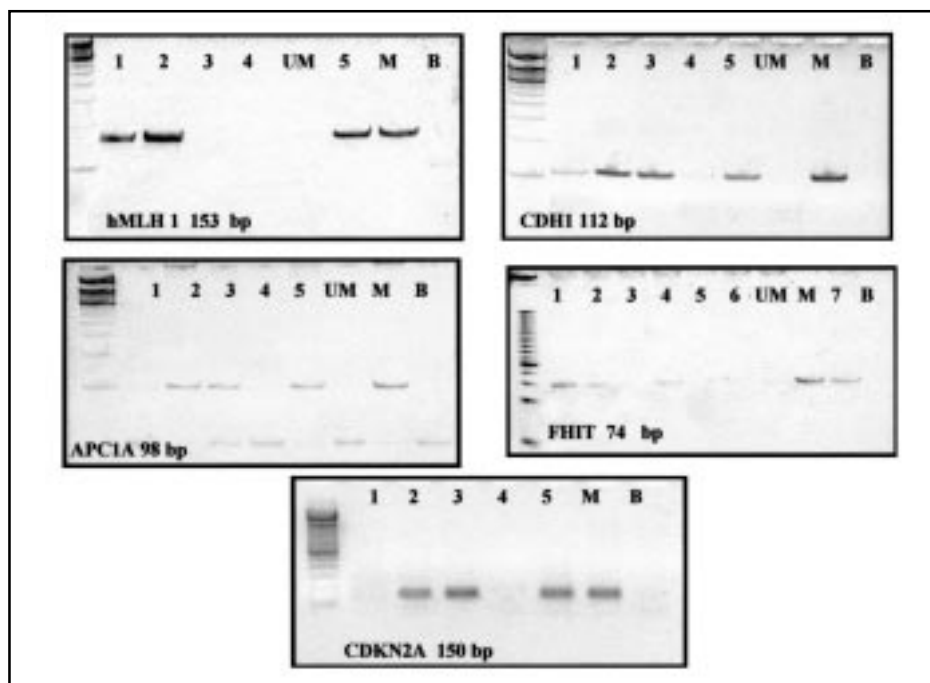


Figura 1. Fotografía compuesta de geles de agarosa que muestra el resultado del análisis de metilación en los 5 genes estudiados, donde se puede observar el tamaño variable de las bandas amplificadas. M= control positivo ADN genómico metilado y modificado, NM= control negativo ADN genómico no metilado y modificado y B= Blanco.

REFERENCIAS

1. ARMILLO R. Descriptive epidemiology of cancer in Chile: 1973-78. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982; 62: 91-4.
2. MEDINA E, KAEMPFFER AM. Mortalidad por cáncer en Chile: Consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1195-202.
3. GOTO T, MONK M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 362-78.
4. JONES PA, LAIRD PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-7.
5. WOLFFE AP, MATZKE MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-6.
6. TAKAI D, JONES PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 2002; 99: 3740-5.
7. ROBERTSON KD, JONES PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21: 461-7.

8. MERLO A, HERMAN JG, MAO L, LEE DJ, GABRIELSON E, BURGER PC ET AL. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995; 1: 686-92.
9. MARUYAMA R, TOYOOKA S, TOYOOKA KO, VIRMANI AK, ZOCHBAUER-MULLER S, FARINAS AJ ET AL. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 514-9.
10. KANG GH, LEE S, KIM JS, JUNG HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-41.
11. ESTELLER M, CORN PG, BAYLIN SB, HERMAN JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3225-9.
12. VIRMANI AK, RATHI A, SATHYANARAYANA UG, PADAR A, HUANG CX, CUNNINGHAM HT ET AL. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1998-2004.
13. BERX G, VAN ROY F. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 289-93.
14. WAJED SA, LAIRD PW, DEMEESTER TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001; 234: 10-20.
15. HERMAN JG, GRAFF JR, MYOHANEN S, NELKIN BD, BAYLIN SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1996; 93: 9821-6.
16. ROA JC, ANABALÓN L, TAPIA O, MARTÍNEZ J, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA, I. Patrón de metilación génica en cáncer de mama. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1069-77.
17. AALTONEN LA, PELTOMAKI P, LEACH FS, SISTONEN P, PYLKKANEN L, MECKLIN JP ET AL. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
18. ROA JC, ARAYA JC, VILLASECA MA, ROA I, CORREA P. Inestabilidad microsatelital y desbalance alélico en lesiones preneoplásicas gástricas. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1227-36.
19. KIM H, KIM YH, KIM SE, KIM NG, NOH SH. Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2003; 200: 23-31.
20. HOUSE MG, GUO M, EFRON DT, LILLEMÖE KD, CAMERON JL, SYPHARD JE ET AL. Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 1004-14.
21. SARBIA M, GEDDERT H, KLUMP B, KIEL S, ISKENDER E, GABBERT HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004; 111: 224-8.
22. OUE N, OSHIMO Y, NAKAYAMA H, ITO R, YOSHIDA K, MATSUSAKI K ET AL. DNA methylation of multiple genes in gastric carcinoma: association with histological type and CpG island methylator phenotype. *Cancer Sci* 2003; 94: 901-5.
23. LEE JH, PARK SJ, ABRAHAM SC, SEO JS, NAM JH, CHOI C ET AL. Frequent CpG island methylation in precursor lesions and early gastric adenocarcinomas. *Oncogene* 2004; 23: 4646-54.
24. KAWAGUCHI K, YASHIMA K, KODA M, TSUTSUMI A, KITAOKA S, ANDACHI H ET AL. FHIT expression in human gastric adenomas and intramucosal carcinomas: correlation with MLH1 expression and gastric phenotype. *Br J Cancer* 2004; 90: 672-7.
25. LEE HS, LEE HK, KIM HS, YANG HK, KIM WH. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* 2003; 200: 39-46.
26. ROCCO A, SCHANDL L, CHEN J, WANG H, TULASSAY Z, McNAMARA D ET AL. Loss of FHIT protein expression correlates with disease progression and poor differentiation in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 84-8.
27. GRAZIANO F, ARDUINI F, RUZZO A, BEARZI I, HUMAR B, MORE H ET AL. Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2784-9.
28. ZHENG ZH, SUN XJ, MA MC, HAO DM, LIU YH, SUN KL. [Studies of promoter methylation status and protein expression of E-cadherin gene in associated progression stages of gastric cancer]. *Yi Chuan Xue Bao* 2003; 30: 103-8.