

Oncología clínica, genómica y epigenómica en cáncer broncogénico. Parte II

CÉSAR MISAE CERECEO-ZAPATA*
ROSARIO GONZAGA PÉREZ*
DIEGO ARMANDO LIMÓN RIVAS*
ALDO ÁLVAREZ MORÁN†
JOSÉ LUIS TELLEZ BECERRA†
CARLOS PÉREZ PLASENCIA§
FEDERICO ÁVILA-MORENO*,¶✉

* Departamento de Investigación en Microbiología, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER).

† Departamento de Cirugía, INER.

§ Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología.

¶ Departamento de Investigación en Bioquímica, Unidad de Investigación, INER.

Trabajo recibido: 05-XII-2009; aceptado: 10-II-2010

Conflicto de intereses: ninguno

Artículo apoyado por el proyecto de investigación básica CONACYT, número 53643.

316

RESUMEN

La aplicación de tecnología de alto rendimiento para el estudio masivo del genoma y epigenoma continúan revolucionando las aportaciones al mundo de la oncología broncopulmonar. Esto sugiere fuertemente la posibilidad de incorporar marca-

Palabras clave: Cáncer pulmonar, marcadores genéticos, genómica, epigenómica.

Key words: Lung cancer, genetic markers, genomics, epigenomics.

dores genéticos y epigenéticos como potenciales normadores y predictores del manejo quimioterapéutico, radioterapéutico o quirúrgico de los pacientes estadiados conforme a las normas de clasificación TNM. Sin embargo, pese a los avances de investigación básica y clínica en cáncer broncogénico, las pruebas genéticas/epigenéticas continúan en espera de ser aceptadas con este propósito. Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación sobre el análisis epigenómico en cáncer broncogénico sugieren la presencia de una huella epigenética en carcinomas pulmonares asociados al tabaquismo, en comparación con aquellos pacientes sin exposición a ese factor de riesgo. Al respecto, los avances de investigación a nivel internacional buscan consolidar y confirmar en un futuro inmediato el desarrollo de pruebas diagnósticas

ABSTRACT

Application of high-throughput technologies for the massive analysis of genome and epigenome is still revolutionizing the contributions into the bronchopulmonary oncology area. This fact strongly supports the possibility that genetic and epigenetic markers could be incorporated as potential guides and predictors of the chemotherapeutic, radiotherapeutic and surgical management of patients staged according to TNM classification norms. Nevertheless, in spite of advancements from basic and clinical research in bronchogenic cancer, incorporation of genetic/epigenetic tests still awaits their acceptance with this purpose. Preliminary results from our research group over epigenomic analysis in bronchogenic cancer suggested the presence of an epigenetic fingerprint in smoking-related pulmonary carcinomas, as compared with patients unexposed to such risk factor. In this context, advancement of research internationally is trying to consolidate and to confirm in the near future the development of genetic/epigenetic confirmatory diagnostic tests for the selection of the best treatment scheme for treating patients with bronchogenic cancer.

confirmatorias de carácter genético/epigenético para el establecimiento del mejor esquema de tratamiento para los pacientes con cáncer broncogénico.

GENÓMICA EN CÁNCER PULMONAR: ABERRACIONES VS. MICROABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Al presente, es amplio el número de alteraciones genéticas descritas en cáncer pulmonar; entre otras están, mutaciones, alteraciones microsátélites, variaciones genéticas de una sola base (polimorfismos genéticos [SNPs, por sus siglas en inglés]), presentes en diversos genes. Dentro de éstos, aquéllos involucrados en la detoxificación a agentes xenobióticos, fármacos y derivados de contaminantes ambientales,^{1,2} genes supresores de tumor, oncogenes, factores de crecimiento, genes de reparación de daño al DNA y reguladores de los procesos de control del ciclo celular.^{3,4}

Asimismo, han destacado estudios sobre el tipo y frecuencia de aberraciones cromosómicas, como pérdidas, deleciones, translocaciones, ganancias o amplificaciones, producto de la inestabilidad cromosómica, promovidas por diversos factores externos, físicos, químicos e incluso factores internos de carácter genético p.ej., la participación de micro-RNAs localizados en sitios frágiles del genoma.⁵ Sobre ello, se ha propuesto que el desarrollo de aberraciones cromosómicas posiblemente sean promovidas desde etapas tempranas de la progresión neoplásica pulmonar como las lesiones precursoras o preneoplásicas pulmonares. Tal es el caso de las metaplasias cuboides que progresan a hiperplasias adenomatosas atípicas, mismas que avanzan a carcinomas bronquioloalveolares y adenocarcinomas (AD) invasores;⁶ así como, hiperplasias de tipo basal escamosa, metaplasias escamosas y/o displasias escamosas, las cuales progresan a carcinomas pulmonares tipo epidermoide (SCC). Mientras que, por otro lado, destacan la hiperplasia celular neuroendocrina idiopática difusa que da origen a tumores carcinoides pulmonares o carcinomas pulmonares de células pequeñas (SCLC).⁷

Reportes de 1992-1994, han registrado el origen e inicio de la hibridación genómica comparativa (CGH, por sus siglas en inglés),⁸⁻¹¹ dejando de manifiesto la transición metodológica ocurrida

en torno al estudio masivo del genoma, desde el uso de metafases de cromosomas para, después, dar paso a la impresión de regiones o bandas citogenéticas completas y más tarde al diseño de arreglos de DNA (microarreglos) en segmentos de DNA en megabases (Mb). A partir del cual, lanzar el diseño de arreglos de alta resolución en submegabases (Sub-Mb). Recientemente, es amplio el conocimiento sobre la presencia de microarreglos de DNA para el estudio de variaciones genéticas de una sola base o SNPs (ej., Affymetrix, 100,000 "100K", 500,000 "500K", 1.8 millones de SNPs "SNP6.0"), que permiten el análisis amplio, profundo y de alta resolución del genoma, incluyendo el estudio de la variación en el número de copias (CNV) de genes conocidos.

En cáncer pulmonar, mediante el uso de CGH de baja resolución, se han descrito diferentes aberraciones cromosómicas de frecuencia variable en regiones cromosómicas extensas (en Mb) o brazos cromosómicos completos, tales como: 1q, 3p, 5p, 6q, 7p, 8q, 9p, 11q, 12p, 12q, 14q, 15q y 17q.^{12,13} Además de otras de mayor precisión en su ubicación citogenética como: 5p15-p14, 8q22, 8q24.1 y 17p13-p12;¹⁴ 11q22, 6q21, 3q26-27, 11q22;¹⁵ y 3q23-29;¹⁶ siendo la región citogenética 3q26 la de mayor frecuencia en diferentes tipos de cáncer.

Entre las diferentes aberraciones cromosómicas estudiadas destacan la presencia de algunos genes de relevancia en la oncología básica y clínica pulmonar, como TP53 gen supresor de tumor presente en la región 17p13.1,¹⁴ cIAP1 y cIAP2 residentes de un fragmento de 1.2 Mb ubicado en 11q22, participando como inhibidores de la apoptosis.¹⁵ EBAG9/RCAS1 codifica para un antígeno de superficie celular implicado en el escape inmunológico antitumoral;¹³ así como el gen TERC que codifica componentes de la DNA telomerasa.¹⁶ La mayoría de ellos, validados mediante diferentes métodos; entre éstos destacan la hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH), cariotipificación espectral (SKY),^{12-14,16,17} así como PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) en tiempo

real, Southern, Northern y Western Blot e inmunohistoquímica.

Adicionalmente, mediante el uso de microarreglos de DNA de resolución intermedia "2-10 Mb", se han señalado un conjunto de aberraciones cromosómicas frecuentemente asociadas a cáncer pulmonar, como la pérdida de las regiones 3p21, 8p22, 9p21-22, 13q22, 17p12-13; así como la frecuente amplificación de las regiones 1q31, 3q25-27, 5p13-14, 8q23-24.^{14,17-21} Sin embargo, ha sido de manera reciente empleando microarreglos de DNA de alta resolución que contienen aproximadamente 13,281 regiones mapeables del genoma, como se han descrito y analizado de manera profunda el genoma de los carcinomas pulmonares.²² Al respecto, un estudio sobre 44 tumores pulmonares (18 AD y 26 SCC) y 34 líneas celulares tipo AD y SCC, identificó 319 regiones con aumento en la CNV. De las cuales, 220 correspondieron a regiones mínimas de alta relevancia oncogénica. Mientras que sólo 93 son regiones mínimas de alta penetrancia, correspondiendo a 74 amplificaciones y 19 deleciones de segmentos con tamaño en promedio de 0.5-1.5 Mb. De éstas, fue posible confirmar sólo 21 regiones con segmentos en Sub-Mb cercanos a 0.5 Mb, conteniendo en promedio 5 genes por región.²²

Con base en lo anterior, ha sido posible proponer la participación de nuevos genes previamente no estudiados o asociados al cáncer broncogénico, algunos de los cuales fueron sugeridos para su posterior análisis funcional. Al respecto, destacan RASSF1, TUSC2, SEMA3B y FHIT, residentes de la región 3p21, con alta frecuencia de pérdida de heterocigocidad;²³ así como, alta frecuencia de delección en genes como ERBB3, gen homólogo del gen supresor de tumor PTEN.²² Al presente, los análisis de alta resolución por CGH han permitido identificar en carcinomas pulmonares, tanto aberraciones citogenéticas comunes entre ambos tipos histológicos AD y SCC como aberraciones cromosómicas diferencialmente presentes entre ambos tipos. Un ejemplo es el segmento 3q26-29 (3q188-199 Mb), amplificado exclusivamente en tumores pulmonares tipo SCC^{18,19,21} con frecuencia del 50-85% de los casos de acuerdo con distintos reportes.¹⁸⁻²¹ También han destacado métodos de alta resolución como el

llamado *submegabase resolution tiling-arrays* (SMRT-Arrays),²⁴ con una resolución de hasta 300 Kb, es decir, en Sub-Mb para la identificación de microamplificaciones y microdeleciones. Método descrito por primera vez en neoplasias pulmonares de estadios clínicos avanzados, permitiendo identificar mediante análisis genómico focal la amplificación del gen BCL2 (18q21) y MYC (8q24); así como, microamplificaciones de alta recurrencia ubicadas en los cromosomas 13, 15, 16 y 22, previamente no descritas,²⁴ como regiones de potencial uso clínico actualmente en estudio en cáncer pulmonar.

Sobre el desarrollo de estudios de genómica funcional en cáncer pulmonar, destacan reportes sobre el aumento en la expresión del gen TERC con aumento en la actividad de telomerasa en 96% de los casos estudiados de carcinomas pulmonares. Lo cual correlaciona con amplificación o aumento de CNV del gen TERC residente de la región 3q26, en contraste con tejido pulmonar histológicamente normal adyacente a la lesión neoplásica pulmonar.¹⁶ Estudios como éstos han logrado proponer a regiones citogenéticas de alta frecuencia; entre ellas, la 3q26 principalmente en carcinomas pulmonares tipo SCC,¹⁶ ubicándose como potencial marcador o posible blanco terapéutico en carcinomas pulmonares tipo SCC.

Respecto a lo anterior, se desconoce si dichos hallazgos correlacionan con la exposición a factores de riesgo como el tabaquismo, así como su penetración o frecuencia en diversas poblaciones de pacientes con cáncer broncogénico. Aunado a ello, ha sido evaluado el impacto causado por el tabaquismo en el genoma mediante estudios de análisis genómico masivo de segregación familiar, como el realizado en 52 familias con antecedentes de cáncer de laringe, orofaringe e hipofaringe, identificando que la principal aberración citogenética de alta penetrancia (90% frecuencia) asociada al tabaquismo es la región 6q23-25, donde residen un número importante de genes candidatos a genes supresores de tumor, entre ellos: SASH1, LATS1, IGF2R y PARK2, ubicados en 6q148.8Mb, 6q150Mb, 6q160.45Mb y 6q161.7Mb, respectivamente. Proponiendo a dicha región como marcador tumoral del epitelio bronquial pulmonar,²⁵ lo cual sugiere que individuos relacionados genéticamente poseen un

factor de riesgo, probablemente debido a la selección o herencia de sitios frágiles en esta ubicación citogenética que aumenta su frecuencia con relación al aumento en el índice tabáquico.²⁵

Wong *et al*, en 2002 señalaron imbalances alélicos y aberraciones de alta frecuencia (75%), ubicadas en 2q, 6p, 10p, 13q, 16q, 17q, 19p, 19q, 20p y 20q, proponiendo a estas regiones como posibles blancos del proceso neoplásico de carcinomas pulmonares tipo AD no asociados al tabaquismo. En contraste, se han identificado aberraciones cromosómicas frecuentes localizadas en 1q, 2p, 3p, 3q, 7q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11q, 13q, 14q, 17p, 18q y 21q para tumores tipo AD, tanto en pacientes fumadores como no fumadores.²⁶ Sugiriendo que sólo ciertas aberraciones en el genoma son preponderantes independientemente del factor de riesgo, quizá porque intervienen factores ambientales externos sobre aquellos factores internos de predisposición genética comunes en la población.

Por otro lado, en un estudio de 18 tumores tipo AD de pacientes no fumadores y 27 tumores tipo AD de pacientes fumadores se identificó imbalances alélicos en común; sin embargo, dichas aberraciones fueron de mayor frecuencia en AD de pacientes con alto índice tabáquico (> 10 cajetillas por año), en contraste con AD de pacientes no fumadores (< 100 cigarrillos en toda la vida), para las regiones: 3p (37% vs. 6%), 6q (46% vs. 12%), 9p (65% vs. 22%), 16p (28% vs. 0%), 17p (45% vs. 11%), y 19p (58% vs. 16%).²⁷ Lo anterior confirma al tabaquismo como factor predominante en la inducción de aberraciones citogenéticas de alta frecuencia, contrario a los pacientes no fumadores. Sin embargo, es necesario mencionar que el alcance de estos estudios, ha sido limitado debido al método empleado para la detección de ganancia alélica y/o pérdida de heterocigocidad a través del análisis restringido de marcadores microsatélites sobre regiones cromosómicas preseleccionadas y sesgadas, soslayando un análisis robusto y amplio del genoma.

Sobre ello, estudios recientes donde se han analizado tumores pulmonares primarios tipo SCC y AD en estadios clínicos tempranos con datos de tabaquismo (32-95 cajetillas por año), empleando microarreglos de cDNA con un total de 8,000 BACs y representando 6,894 genes conocidos,

permitió describir 228 genes aberrantes en tumores tipo SCC y 194 genes en tumores tipo AD, de los cuales sólo 25 muestran aumento de CNV y 63 alto índice de pérdida/delección, comunes entre ambos AD y SCC. Mientras que 57 genes diferencialmente aberrantes entre ambos,²⁸ sugirieron el probable desarrollo de aberraciones cromosómicas comunes desde etapas tempranas del desarrollo neoplásico pulmonar tipo AD y SCC. Así, se han descrito recientemente aberraciones comunes entre carcinomas *in situ* y carcinomas pulmonares invasores tipo SCC, destacando aberraciones localizadas en la región 5p15.2 y 5p13.2, las cuales poseen potenciales blancos terapéuticos como: TRIO y GDNF, entre otros.²⁹ De este modo, con el uso de dichas plataformas en Sub-Mb ha sido posible correlacionar el aumento en CNV con aumento en los niveles de expresión génica de estos loci frecuentemente amplificados (<0.5 Mb), destacando genes como p63, claudina y fosfatidil inositol glycano-X.²² También es posible la detección de aumento en la expresión génica con ausencia del aumento en CNV o ganancia/amplificación,²² sugiriendo la participación de alteraciones a nivel epigenético mientras que, por el contrario es posible amplificaciones del brazo corto del cromosoma 3 (3q) en correlación con aumento en la expresión del gen PIK3CA,¹² gen importante en la patogenia de NSCLC. Estudios como éstos han destacado debido al uso de arreglos de alta resolución, si bien basados en BACs pero en Sub-Mb en serie (SMRT), permitiendo la identificación de nuevos genes como posibles candidatos a marcadores pronóstico o posiblemente de predisposición genética en cáncer pulmonar.

En un estudio reciente publicado por la revista Nature Genetics (2008), mediante el uso de plataformas de alta resolución para el estudio de secuencias polimórficas (Illumina), se ha demostrado una alta asociación de variaciones genéticas de una sola base presentes en la región telomérica 5p13.33 con predisposición genética al desarrollo de cáncer broncogénico. Dicho estudio de casos y controles incluyó el análisis de 315,194 SNPs sobre 1,291 pacientes y 1,561 controles, adicional a la inclusión *in silico* de la base de datos de tres cohortes de pacientes previamente reportadas (*Casos y controles de Toronto*, cohor-

te HUNT2/Tromsø y cohorte CARET), para un total de 3,259 pacientes y 4,159 individuos control. De éstos, mediante un análisis de segregación por marcadores de ancestría (europeos) y análisis de desequilibrio de ligamiento fue posible identificar SNPs de alta significancia (aproximadamente 8 SNPs), sobre un total de 2,971 pacientes y 3,746 controles, entre los que destacan el SNP rs402710 localizado en la región codificante del gen CLPTM1L, involucrado en la inducción de apoptosis, así como el polimorfismo rs2736100 localizado en el intrón 1 del gen TERT.³⁰ Al respecto, un estudio adicional mediante el uso de esta plataforma de microarreglos Illumina (HumanHap550), analizó cerca de 561,466 SNPs, sobre 1,978 casos y 1,478 controles, confirmó la identificación de SNPs asociados al riesgo de cáncer pulmonar en la misma región 5p15.33 con alta significancia para el SNP rs401681 del gen CLPTM1L.³¹ Sobre este aspecto es importante señalar que con dichos estudios de alta resolución es posible resaltar la alta relevancia probable que juega dicha región telomérica 5p13.33, siendo particularmente el gen residente más visible la telomerasa (TERT), recientemente asociado al riesgo en carcinomas pulmonares tipo AD,³² asimismo, ha sido posible evaluar no sólo su papel funcional en cáncer, sino a nivel cuantitativo sus niveles de expresión en sus isoformas alfa y beta de los transcritos de TERT, los que han sido asociados con la progresión neoplásica y pobre pronóstico en pacientes con cáncer pulmonar.³³ Así, podemos mencionar que tanto TERC¹⁶ como TERT,^{30,32} permanecen como potenciales marcadores funcionales o posibles blancos terapéuticos en cáncer broncogénico por su ubicación telomérica o subtelomérica, adicional al posible aumento en CNV como lo sugieren algunos autores.

Por otra parte, reportes relativamente recientes señalan microaberraciones cromosómicas representadas por el aumento en CNV, capaces de inducir aumento en los niveles de expresión génica aunque, por el contrario, también es posible identificar alteraciones en los niveles de expresión génica independientes del aumento en CNV. Siendo esto último, más bien dependiente de alteraciones epigenéticas, llamando la atención de que alteraciones en la expresión génica de la región subtelomérica 7p22.3-p22.1 sea de-

pendiente de CNV, y que la región 7p15.2 con mayor ubicación subcentromérica sea independiente de CNV e incluso, quizás, independiente de metilación de su promotor aunque dependiente del estado de activación de la cromatina como la acetilación de histonas, como lo sugieren los resultados obtenidos por Stransky *et al.*³⁴ Aunado a lo anterior, es importante señalar que resultados recientes (de nuestro grupo) indican alteraciones como aumento en CNV de alta frecuencia en regiones subteloméricas, como 7p22.3-p22.1 y 7p21.3-p21.1; así como subcentroméricas 7p15.3 y 7p15.2, durante la progresión neoplásica pulmonar (datos enviados a publicación). Dichas regiones, las cuales probablemente contengan genes dependientes y/o independientes de mecanismos genéticos (CNV) o epigenéticos (metilación del DNA y/o modificación de histonas), puedan muy probablemente consolidarse a mediano plazo como marcadores genéticos y/o epigenéticos tempranos o pronóstico en cáncer pulmonar.

EPIGENÉTICA: HIPERMETILACIÓN DEL DNA GENÓMICO EN CÁNCER PULMONAR

Desde el punto de vista biológico y clínico, el silenciamiento epigenético por metilación de genes supresores de tumor, genes de reparación de daño al DNA, genes inductores de apoptosis, entre otros, contribuyen en parte al comportamiento biológico del tumor y muy probablemente en la evolución clínica del paciente. Su estudio abre la posibilidad de identificar aberraciones tempranas del epigenoma durante la transformación maligna pulmonar mediante procedimientos no invasivos en los pacientes. A este respecto, se ha propuesto que la detección de alteraciones epigenéticas del DNA libre en circulación puedan consolidarse como herramientas para la identificación de biomarcadores de eventos oncológicos tempranos o tardíos sobre el pronóstico o supervivencia de los pacientes en cáncer broncogénico.^{35,36}

Estudios recientes en carcinomas pulmonares tipo AD describen correlación entre bajo grado de metilación, con aumento en la expresión génica y alto índice de ganancia/amplificación en genes antiapoptóticos miembros de la familia Bcl-2 (1q21-23), vecinos del gen Mcl1 inhibidor

de apoptosis.³⁷ Adicionalmente, diversos genes ampliamente estudiados en distintos tipos de neoplasias han destacado: APC, BRCA-1, E-cadherina, LKB1, VHL, hMLH1, MGMT.³⁸ Algunos de los cuales sufren pérdida de la expresión génica a través de hipermetilación del DNA. Contribuyendo a la inestabilidad cromosómica, así como a la permanencia de alteraciones microsatélites, acumulación acelerada de mutaciones o epimutaciones debido a fallas en la capacidad de reparación del daño al DNA.^{38,39}

En cáncer pulmonar, frecuentemente los estudios han sido enfocados al análisis de grupos preseleccionados de genes convencionalmente asociados al cáncer en general, como P53, ciclina D, Rb, p15, p16, etc. Estos últimos, codificando para inhibidores de cinasas-dependientes de ciclinas, reguladores de las vías de fosforilación de Rb e implicadas en el control del ciclo celular. No obstante, es necesario resaltar que ambos genes, P15 y p16 residentes de 9p21, se encuentran frecuentemente hipermetilados en distintos tipos de neoplasias.^{40,41} Aunque esta región que con frecuencia es eliminada en carcinomas pulmonares tipo AD y SCC,^{18,21,22} probablemente explique por qué sólo en 60% de los casos es posible detectar su hipermetilación que aumenta conforme avanza el estadio clínico de carcinomas pulmonares particularmente del tipo SCC, de acuerdo con reportes de hace una década.⁴² Así, es posible identificar marcadores citogenéticos y/o epigenéticos en común o diferencialmente presentes de acuerdo con el avance del estadio clínico de los pacientes con cáncer broncogénico.

Sin embargo, de manera contradictoria otros reportes indican que el grado de metilación es dependiente del tipo y origen histológico del tumor pues los patrones de metilación parecen no cambiar entre bajo y alto grado de diferenciación.⁴³ Lo cual, probablemente apoya la hipótesis donde el patrón de alteraciones epigenéticas son comunes a las distintas etapas del desarrollo neoplásico pulmonar. Mientras que, las aberraciones citogenéticas o cromosómicas mantienen un comportamiento diferente, dependientes del tipo histológico, grado de diferenciación y exposición a factores de riesgo.

Al respecto, un estudio de 107 tumores pulmonares primarios (45, AD; 43, SCC; y 19, otros tipos) demostró que 82% de los casos presenta-

ban hipermetilación en secuencias promotoras en sólo 1 de 8 genes estudiados, convencionalmente asociados al cáncer. Entre ellos: p16^{INK4a}, RAR-b (receptor de ácido retinoico-b), E-Cadherina (ECAD), DAPK, RASSF1A (involucrados en apoptosis), O⁶-methyl-guanina DNA-methyl-transferasa (MGMT) (reparación del DNA), y TIMP-3 (inhibidor tisular de metaloproteinasas),⁴⁴ reflejando que el análisis selectivo o sesgado de genes hipermetilados asociados al cáncer en general, no ha permitido proponer o consolidar su detección clínica en circulación. Donde es probable que un grupo de genes aún no identificados puedan ser propuestos como marcadores de alta representación, sensibilidad y especificidad para el diagnóstico, pronóstico o diseño terapéutico.

Lo anterior queda confirmado en un estudio de 85 pacientes, 64 tipo AD y 21 tipo SCC, evidenciando hipermetilación del DNA en circulación en baja frecuencia 6-18%, comparado con 1-8% de pacientes de patologías pulmonares benignas para los genes p16^{INK4a}, RAR-b, DAPK, RASSF1A y MGMT.⁴⁵ Quedando de manifiesto su escasa sensibilidad y especificidad diagnóstica. Aunado a esto, un estudio en líneas celulares de cáncer pulmonar y carcinomas pulmonares primarios tipo AD y SCC, empleando microarreglos de DNA para la detección de metilación de secuencias promotoras demostró, que sólo cerca del 11% de 288 genes estudiados relacionados con cáncer muestran hipermetilación. Destacando entre otros: HIC1, ASC, RASSF1A, RIPK3, PRK-DBP y PAX3, previamente estudiados en otros tipos de cáncer con mayor frecuencia de metilación; evidenciando cierto grado de correlación entre hipermetilación del promotor con bajo nivel de expresión del RNAm sólo en líneas celulares y no para tumores primarios.⁴⁶ No obstante, trabajos recientes han propuesto la detección de hipermetilación del gen ASC/TSM1 en muestras de esputo como factor pronóstico en una frecuencia de 52-77%, principalmente en pacientes con tumores tipo AD en estadios clínicos avanzados.⁴⁷

En la actualidad, los estudios restringidos a un grupo preseleccionado de genes convencionalmente asociados al cáncer, muestra sesgos y limitaciones sobre la identificación de verdaderos marcadores hipermetilados de potencial uso diag-

nóstico temprano, tardío o pronóstico. Con lo que ha sido necesario el desarrollo de estrategias de análisis masivo del DNA genómico relacionados con los eventos epigenéticos de metilación del DNA, asociados al comportamiento biológico y evolución clínica de los carcinomas pulmonares. Asimismo, resultados recientes publicados por Anglim *et al*, 2008, sobre el análisis de 42 loci genéticos en carcinomas pulmonares tipo SCC, mostraron que sólo 8 loci mantienen aumento en los niveles de metilación ($p < 0.0001$), comparado con tejido pulmonar adyacente libre de lesión. Mostrando niveles de especificidad y sensibilidad diagnóstica del 95% sobre genes como: GDNF, MTHFR, OPCML, TNFRSF25, TCF21, PAX8, PTPRN2 y PITX2. Sin embargo, sólo GDNF y MTHFR mostraron criterios suficientes como potenciales biomarcadores, independientemente del estadio clínico, género y/o factor de riesgo; es decir, como potenciales marcadores no-estadio específicos, como lo sugieren los autores.⁴⁸

Recientes evidencias continúan aportando conocimiento en torno a la pertinencia de incorporar al diagnóstico en cáncer broncogénico, la detección del DNA metilado en circulación en plasma de pacientes como una herramienta de análisis cuantitativo-específico enfocada a la predicción de índices de sobrevida y/o pronóstico de los pacientes con cáncer broncogénico.⁴⁹

PERSPECTIVAS: EPIGENÓMICA EN LA BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES TEMPRANOS O BLANCOS TERAPÉUTICOS EN CÁNCER BRONCOGÉNICO

Recientemente se ha impulsado el desarrollo de nuevas estrategias para el análisis sistemático y masivo de la regulación epigenética del cáncer en general.^{50,51} Asimismo, han surgido planteamientos necesarios sobre el papel de la regulación epigenética en términos comparativos entre células normales (no neoplásicas), tumores primarios y metastáticos. Así como las posibles interacciones de regulación entre el genoma y epigenoma en cáncer, basado necesariamente en el análisis computacional y bioinformático.⁵²

No obstante, es importante hacer mención sobre los diferentes métodos de enriquecimiento de

los segmentos metilados del genoma, dentro de éstos destacan cuatro estrategias en general: i) la conversión por bisulfito de sodio, donde son transformadas *in vitro* aquellas secuencias no metiladas (citosinas no metiladas hacia uracilo) a través de una reacción por sulfonación-desaminación-desulfonación alcalina, permaneciendo intactas las secuencias metiladas e hipermetiladas para su posterior análisis; ii) enriquecimiento por enzimas de restricción sensibles a metilación a través del cual, la mayor parte de las secuencias CpGs no metiladas serán eliminadas por restricción, permaneciendo de igual modo las secuencias CpGs metiladas; iii) purificación del DNA genómico metilado por ensayos de afinidad, empleando proteínas que contienen dominios de unión al DNA metilado (del inglés, *methyl binding domains* [MBD]); y, iv) método de inmunoprecipitación por anticuerpos anti-5'metil-citosinas a través de los cuales es posible la hibridación en diferentes plataformas de microarreglos (illumina, affymetrix, agilent, solexa, nimbleGen, etc.) para su posterior interpretación bioinformática.⁵³

En cáncer broncogénico destacan entre el año 2007 y 2008 los primeros trabajos sobre el análisis sistemático de los perfiles de metilación global del DNA genómico, como mecanismo de regulación de la expresión génica en carcinomas pulmonares del grupo NSCLC. Tales estudios dieron su inicio promovidos por la empresa NimbleGene (Roche NimbleGene, Inc. Madison WI, EU). En un primer estudio empleando el método de purificación de DNA metilado llamado MIRA (del inglés, *methylated-CpG island recovery assay*), basado en la técnica MBD e hibridación en arreglos que representan por separado a los cromosomas 2, 7, 12 y 17, los cuales contienen 385,000 oligonucleótidos de un tamaño de 50 bases c/u, alcanzando una cobertura o resolución por cromosoma de 38pb entre cada oligonucleótido impreso por microarreglo (NimbleGen ENCODE array), fue posible identificar hipermetilación, tanto en líneas celulares tipo AD comparado con líneas celulares de tejido bronquial normal como en carcinomas pulmonares tipo AD y SCC de estadios clínicos tempranos para los segmentos génicos que contienen clusters de genes HoxA y HoxD, cromosomas 7 y 2, respectivamente. Entre los que destacan HoxA3 y HoxA5, con alto grado de metilación 75-100%

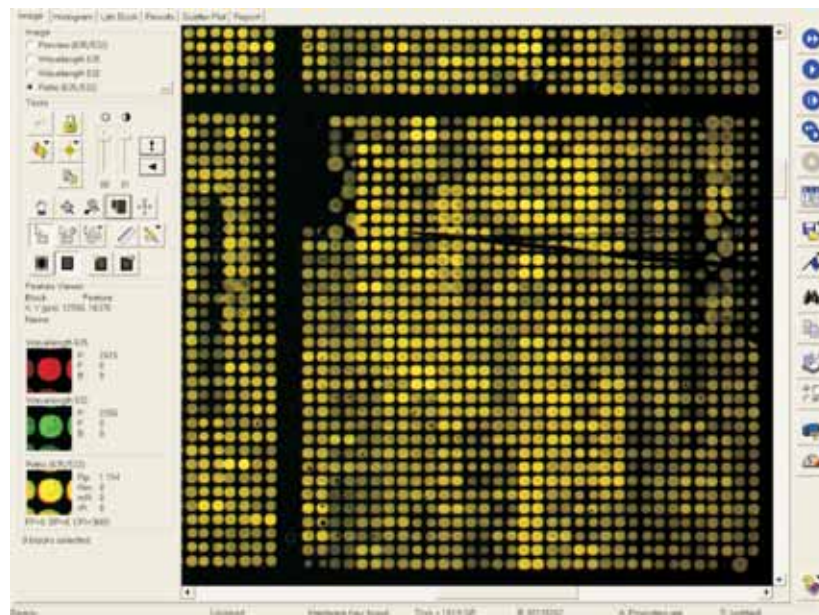
en carcinomas tipo SCC. Mientras que HoxA7 y HoxA9, mostraron alto nivel de metilación (80%) en carcinomas estadio clínico I, comparado con tejido normal pulmonar adyacente. Ubicándose HoxA9 como un nuevo potencial biomarcador de estadios clínicos tempranos en NSCLC.⁵⁴ Lo cual quedó confirmado mediante el uso de una segunda plataforma de microarreglos integrado por secuencias CpGs, que contienen 237,000 oligonucleótidos cubriendo aproximadamente 27,800 islas CpGs de secuencias promotoras (Agilent, Sta., Clara, CA).⁵⁴

En un segundo trabajo, 2008,⁵⁵ utilizando microarreglos de DNA con una resolución de hasta 100pb (NimbleGen, HG18Tiling Set 17, 19) para el estudio de los cromosomas 6, 7 y 8, permitió analizar diferencias en los perfiles de metilación del DNA genómico entre distintos estadios clínicos de carcinomas pulmonares tipo SCC. Haciendo posible identificar mayor grado de metilación hacia la región telomérica y subtelomérica del brazo corto del cromosoma 8 en carcinomas tipo SCC de estadio clínico temprano I, comparado con tejido pulmonar normal. Adicionalmente, esta aproximación en torno a la progresión clínica de carcinomas pulmonares tipo SCC de estadios clínicos I, II y III, arrojó tres biomarcadores hipermetilados en sus secuencias CpGs promotoras. Siendo éstos: OTX1, OSR1 y NR2E1, con 100% de frecuencia de un total de 20 carcinomas tipo SCC comparado con tejido pulmonar normal. Ubicándose como nuevos marcadores adecuados a ser validados en estudios clínicos y diagnósticos de estadios tempranos en cáncer pulmonar.⁵⁵

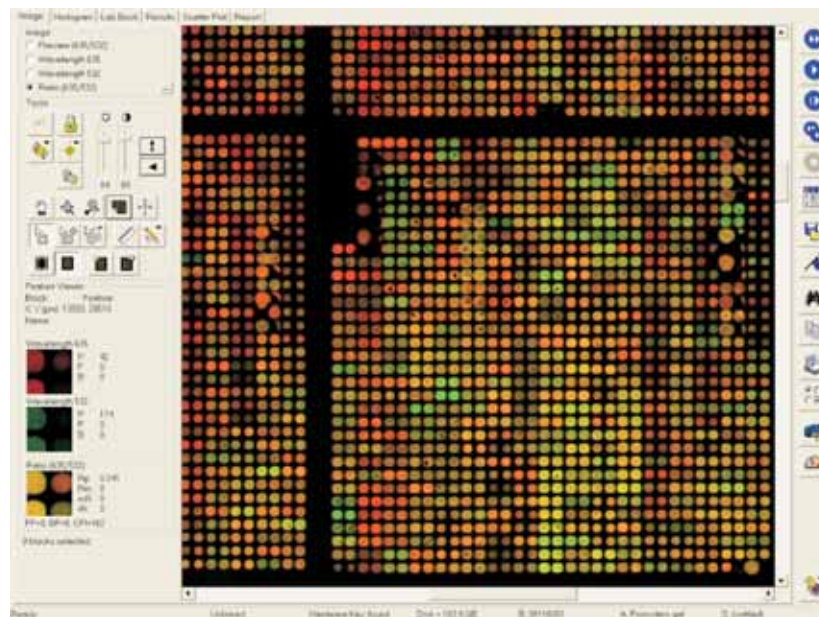
Por último, queremos mencionar que, al presente, en la unidad de investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) desarrollamos una línea de investigación enfocada al estudio del epigenoma (metilación del DNA) en la progresión neoplásica pulmonar (lesiones pulmonares precursoras, lesiones neoplásicas *in situ* y carcinomas invasores- metastáticos). Parte de este trabajo de investigación ha sido desarrollado, mediante dos estrategias de enriquecimiento del DNA genómico metilado, como son el uso combinado de enzimas de restricción sensibles a metilación e inmunoprecipitación del DNA metilado mediante anticuerpos anti-5-metil-citosinas; a través del

cual, resultados preliminares realizando CGH en la plataforma de microarreglos en Sub-Mb SMRT-27K, ha sido posible identificar regiones genéticas hipermetiladas e hipometiladas de alta prevalencia en muestras de pacientes bajo atención médica en el INER. Al respecto, la Figura 1 muestra el perfil de hibridación mediante la emisión de fluorescencia del DNA genómico hipermetilado (marcado previamente en rojo) e hipometilado (verde) de un mismo cuadrante impreso en microarreglos SMRT-27K, donde son comparadas dos muestras de pacientes con carcinoma broncogénico tipo AD. En dicha imagen se observan diferencias en el patrón de metilación de un paciente no expuesto a factores de riesgo (1A), comparado de otro paciente con datos de tabaquismo (1B), el cual muestra mayores segmentos (puntos en rojo) hipermetilados. En la Figura 2, se muestra el tipo de análisis bioinformático realizado posterior al CGH; así como, un acercamiento al cromosoma 7 de una muestra de carcinoma broncogénico derivada de paciente masculino de 52 años con ausencia de factores de riesgo. Las imágenes mostradas indican de forma preliminar segmentos citogenéticos mayoritariamente hipometilados en pacientes sin antecedentes de factores de riesgo, de manera contraria a los pacientes con tabaquismo (hipermetilados).

Dicha estrategia experimental estandarizada por nuestro grupo de investigación en el INER, permitirá identificar y evaluar los patrones de metilación del genoma de neoplasias pulmonares asociados a factores de riesgo en la población de pacientes oncológicos de este Instituto. Asimismo, nos encontramos en el desarrollo experimental y análisis de una cohorte de pacientes con cáncer broncogénico bajo atención médica en el INER en conjunto con el Instituto Nacional de Cancerología (previa firma de consentimiento informado de pacientes). Esto permitirá sentar las bases para la generación de nuevos conocimientos de carácter básico y clínico sobre el epigenoma (estado de activación de la cromatina, blancos génicos regulados por metilación y/o factores de transcripción aberrantes en cáncer broncogénico) para la identificación de posibles biomarcadores de aparición temprana en la progresión neoplásica pulmonar. Todo ello, como propuesta para el desarrollo de un diagnóstico temprano,



A

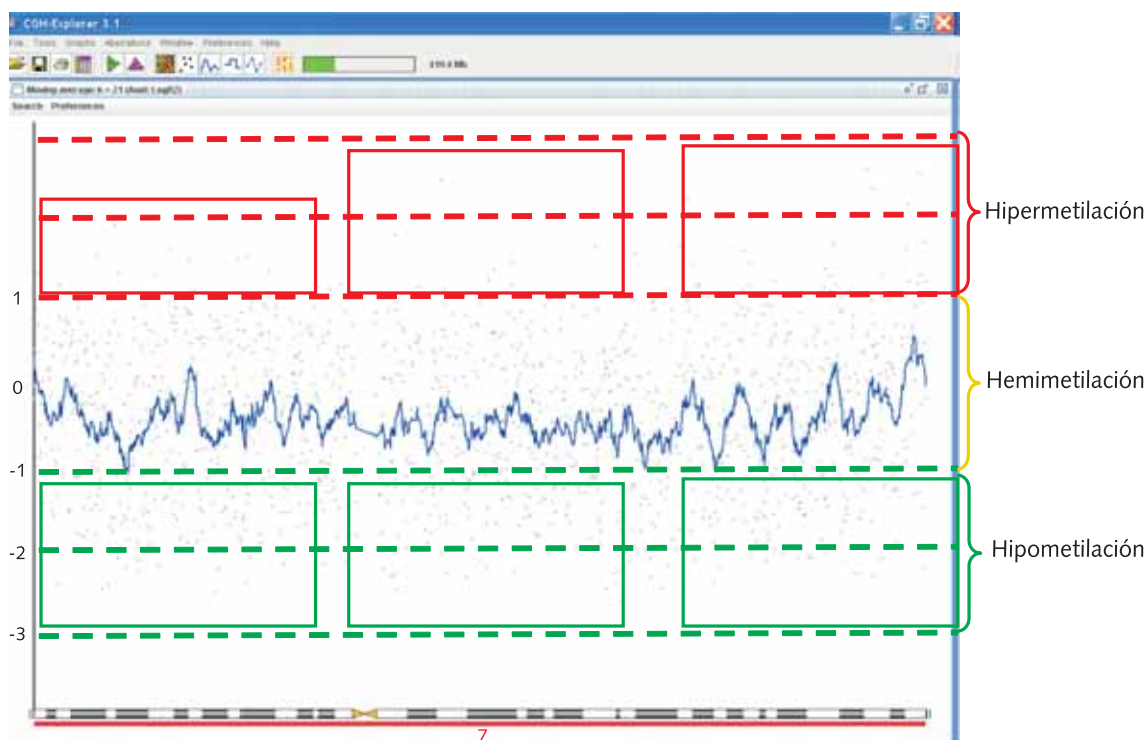


B

www.medigraphic.org.mx

Hibridación genómica comparativa (CGH) sobre plataforma de microarreglos de DNA de alta resolución en submegabases, SMRT-27K

Figura 1. CGH en microarreglos de DNA que muestra un mismo cuadrante impreso en microarreglos SMRT-27K, con el perfil de metilación (fluorescencia en verde, hipometilado; amarillo, hemimetilado; y rojo, hipermetilado) del DNA genómico de carcinomas pulmonares tipo AD de dos pacientes, no expuesto a factores de riesgo (A) y expuesto a tabaquismo (B). Imagen capturada empleando escáner y el programa GenePix.



Análisis epigenómico del perfil de metilación del DNA, mediante CGH en microarreglos, SMRT-27K

Figura 2. Análisis bioinformático posterior a CGH en microarreglos SMRT-27K, que muestra el perfil de metilación del cromosoma 7 de una muestra representativa de carcinomas pulmonares tipo AD, en ausencia de factores de riesgo. Los recuadros indican regiones genéticas (puntos) hipermetiladas (rojo) e hipometiladas (verde). Análisis empleando los programas bioinformáticos MD-SeeGH y CGH-Explorer versión 3.1.

análisis de predicción de respuesta al tratamiento, pronóstico y supervivencia de los pacientes oncológicos pulmonares bajo la atención médica de los Institutos Nacionales de Salud de nuestro país.

Agradecimientos:

A CONACYT, por el financiamiento otorgado con el proyecto de investigación básica, número 53643.

REFERENCIAS

1. Raimondi S, Boffetta P, Anttila S, et al. *Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study.* Mut Res 2005;592:45-57.
2. Skuladottir H, Autrup H, Autrup J, et al. *Polymorphisms in genes involved in xenobiotic metabolism and lung cancer risk under the age of 60 years. A pooled study of lung cancer patients in Denmark and Norway.* Lung Cancer 2005;48:187-199.
3. Ryk C, Kumar R, Thirumaran RK, Hou SM. *Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, APEX1, XRCC3 and NBS1, and the risk for lung cancer in never- and ever-smokers.* Lung Cancer 2006;54:285-292.
4. Zienoldiny S, Campa D, Lind H, et al. *Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer.* Carcinogenesis 2006;27:560-567.
5. Zhang L, Huang J, Yang N, et al. *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.* Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:9136-9141.
6. Aviel-Ronen S, Coe BP, Lau SK, et al. *Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:10155-10160.
7. Greenberg AK, Yee H, Rom WN. *Preneoplastic lesions of the lung.* Respir Res 2002;3:20.
8. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.* Science 1992; 258:818-821.

9. Matsuta M, Nishiya I. *Comparative genomic hybridization (CGH)*. Hum Cell 1993;6:231-236.
10. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, et al. *Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization*. Hum Genet 1993;90:590-610.
11. Houldsworth J, Chaganti RS. *Comparative genomic hybridization: an overview*. Am J Pathol 1994;145:1253-1260.
12. Massion PP, Kuo WL, Stokoe D, et al. *Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. Cancer Res 2002;62:3636-3640.
13. Berrieman HK, Ashman JN, Cowen ME, Greenman J, Lind MJ, Cawthwell L. *Chromosomal analysis of non-small-cell lung cancer by multicolour fluorescent in situ hybridization*. Br J Cancer 2004;90:900-905.
14. Sy SM, Wong N, Lee TW, et al. *Distinct patterns of genetic alterations in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung*. Eur J Cancer 2004;40:1082-1094.
15. Dai Z, Zhu WG, Morrison CD, et al. *A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes*. Hum Mol Genet 2003;12:791-801.
16. Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Imoto I, Fujisawa T, Inazawa J. *TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res 2003;9:4705-4713.
17. Sy SM, Fan B, Lee TW, et al. *Spectral karyotyping indicates complex rearrangements in lung adenocarcinoma of non-smokers*. Cancer Genet Cytogenet 2004;153:57-59.
18. Petersen I, Bujard M, Petersen S, et al. *Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung*. Cancer Res 1997;57:2331-2335.
19. Bjorkqvist AM, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, et al. *DNA gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma*. Genes Chromosomes Cancer 1998;22:79-82.
20. Luk C, Tsao MS, Bayani J, Shepherd F, Squire JA. *Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet 2001;125:87-99.
21. Pei J, Balsara BR, Li W, et al. *Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas*. Genes Chromosomes Cancer 2001;31:282-287.
22. Tonon G, Wong KK, Maulik G, et al. *High-resolution genomic profiles of human lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:9625-9630.
23. Balsara BR, Testa JR. *Chromosomal imbalances in human lung cancer*. Oncogene 2002;21:6877-6883.
24. Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, et al. *A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome*. Nat Genet 2004;36:299-303.
25. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, et al. *A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25*. Am J Hum Genet 2004;75:460-474.
26. Wong MP, Lam WK, Wang E, Chiu SW, Lam CL, Chung LP. *Primary adenocarcinomas of the lung in nonsmokers show a distinct pattern of allelic imbalance*. Cancer Res 2002;62:4464-4468.
27. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, et al. *Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers*. Cancer Res 2001;61:1309-1313.
28. Jiang F, Yin Z, Caraway NP, Li R, Katz RL. *Genomic profiles in stage I primary non small cell lung cancer using comparative genomic hybridization analysis of cDNA microarrays*. Neoplasia 2004;6:623-635.
29. Garnis C, Davies JJ, Buys TP, et al. *Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression*. Oncogene 2005;24:4806-4812.
30. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, et al. *Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33*. Nat Genet 2008;40:1404-1406.
31. Wang Y, Broderick P, Webb E, et al. *Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk*. Nat Genet 2008;40:1407-1409.
32. Landi MT, Chatterjee N, Yu K, et al. *A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma*. Am J Hum Genet 2009;85:679-691.
33. Mavrogiannou E, Strati A, Stathopoulou A, Tsaroucha EG, Kaklamani L, Lianidou ES. *Real-time RT-PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase splice variants in tumor cell lines and non-small cell lung cancer*. Clin Chem 2007;53:53-61.
34. Stransky N, Vallot C, Reyat F, et al. *Regional copy number-independent deregulation of transcription in cancer*. Nat Genet 2006;38:1386-1396.
35. Wong IH, Lo YM, Johnson PJ. *Epigenetic tumor markers in plasma and serum: biology and applications to molecular diagnosis and disease monitoring*. Ann N Y Acad Sci 2001;945:36-50.
36. Xue X, Zhu YM, Woll PJ. *Circulating DNA and lung cancer*. Ann N Y Acad Sci 2006;1075:154-164.
37. Song L, Coppola D, Livingston S, Cress D, Haura EB. *Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells*. Cancer Biol Ther 2005;4:267-276.
38. Baylin SB, Herman JG. *DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*. Trends Genet 2000;16:168-174.
39. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. *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 2000;60:2368-2371.
40. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. *Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies*. Cancer Res 1997;57:837-841.
41. Wong IH, Ng MH, Lee JC, Lo KW, Chung YF, Huang DP. *Transcriptional silencing of the p16 gene in human myeloma-derived cell lines by hypermethylation*. Br J Haematol 1998;103:168-175.
42. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, et al. *Aberrant methylation of p16INK4a is an early event in lung can-*

- cer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11891-11896.
43. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, et al. *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns*. *Nat Genet* 2000;24:132-138.
 44. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. *Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers*. *Cancer Res* 2001;61:249-255.
 45. Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, et al. *Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer*. *Clin Cancer Res* 2005;11:1219-1225.
 46. Fukasawa M, Kimura M, Morita S, et al. *Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers*. *J Hum Genet* 2006;51:368-374.
 47. Machida EO, Brock MV, Hooker CM, et al. *Hypermethylation of ASC/TMS1 is a sputum marker for late-stage lung cancer*. *Cancer Res* 2006;66:6210-6218.
 48. Anglim PP, Galler JS, Koss MN, et al. *Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for squamous cell lung cancer*. *Mol Cancer* 2008;7:62.
 49. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, et al. *Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer*. *Lung Cancer* 2009;64:92-97.
 50. Gius D, Bradbury CM, Sun L, et al. *The epigenome as a molecular marker and target*. *Cancer* 2005;104:1789-1793.
 51. Cho HS, Park JH, Kim YJ. *Epigenomics: novel aspect of genomic regulation*. *J Biochem Mol Biol* 2007;40:151-155.
 52. Brena RM, Costello JF. *Genome-epigenome interactions in cancer*. *Hum Mol Genet* 2007;16 Spec No 1:R96-105.
 53. Zilberman D, Henikoff S. *Genome-wide analysis of DNA methylation patterns*. *Development* 2007;134:3959-3965.
 54. Rauch T, Wang Z, Zhang X, et al. *Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:5527-5532.
 55. Rauch TA, Zhong X, Wu X, et al. *High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:252-257.

✉ Correspondencia:

Dr. Federico Ávila-Moreno,
Departamento de Investigación en
Bioquímica, Unidad de Investigación.
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
Calzada de Tlalpan 4502, colonia
Sección XVI. México, D.F., 14080.
Correo electrónico:
favila@iner.gob.mx;
favila@cinvestav.mx