

Análisis de re-arreglos genómicos en cáncer de próstata agresivo

Garza-Cortez R,¹ Cárdenas-Cadena SA,^{2,3} Gómez-Guerra LS,¹ Garza-Guajardo R,⁴ Ortíz-López R,^{2,3} Grondin Y,³ Leach RJ,⁵ Reveles XT,⁶ Rojas-Martínez A.^{2,3}



■ RESUMEN

Los estadios iniciales del cáncer de próstata (CaP) representan un reto clínico, debido a la carencia de biomarcadores de evolución tumoral que definan si el mismo permanecerá localizado o cursará de manera agresiva y letal. En este trabajo se realizó un análisis sobre ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en dos grupos de muestras (CaP agresivo y no agresivo) con el objetivo de identificar *loci* asociados a una evolución agresiva o no agresiva del CaP.

Métodos: Se realizaron microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) en muestras de ADN proveniente de tejido prostático (tumor primario) embebido en parafina de pacientes con diagnóstico de CaP agresivo ($n = 15$) y no agresivo ($n = 8$). Los datos proporcionados por el aCGH fueron analizados utilizando el agrupamiento no supervisado (centroídes k-promedio) y supervisado (centroídes reducidos) software R.

■ ABSTRACT

Initial stages of prostate cancer are a clinical challenge due to the lack of tumor progression biomarkers that define whether the tumor will remain localized or will become aggressive and lethal. In the present study, a gains and losses analysis of chromosomal regions was carried out on two sample groups (aggressive prostate cancer and non-aggressive prostate cancer) to identify loci associated with aggressive or non-aggressive prostate cancer progression.

Methods: Microarray based comparative genomic hybridization was carried out in paraffin-embedded DNA samples of prostatic tissue (primary tumor) from patients diagnosed with aggressive prostate cancer ($n = 15$) and with non-aggressive prostate cancer ($n = 8$). Data resulting from array comparative genomic hybridization were analyzed using R software non-supervised grouping (*k*-median centroids) and supervised grouping (reduced centroids).

Results: Non-supervised grouping was not correlated with prostate cancer aggressiveness. A classifying profile of

1 Departamento de Urología, Facultad de Medicina. Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

2 Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Facultad de Medicina.

3 Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud. U.A.N.L. Monterrey.

4 Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Monterrey.

5 Department of Cell and Structural Biology, Universidad de Texas. Health Science Center.

6 Combinatrix Molecular Diagnostics, Irvine, CA.

Correspondencia: R Garza-Cortez. Av. Fco. I. Madero y Gonzalitos s/n 1er- piso No. 18. Col. Mitras centro. C. P. 64460, Monterrey, N. L. México. Teléfono: 81 8333 1713, 8389 1111, Ext.: 2136, 3136. Correo electrónico: jrcor77@yahoo.com, jeff.cortes-gonzalez@ki.se

Resultados: El agrupamiento no supervisado no generó correlación con la agresividad del CaP. El agrupamiento supervisado permitió obtener un perfil clasificador de aproximadamente 150 regiones cromosómicas, con un error de clasificación y falsos positivos de 30% y 20% respectivamente.

Conclusiones: Se encontraron múltiples *loci* con y sin reportes previos de asociación a CaP agresivo. Debido al pequeño tamaño de la muestra se debe realizar un análisis más extenso para confirmar la asociación de dichas regiones encontradas con la agresividad del CaP.

Palabras clave: Cáncer de próstata agresivo, microarreglos genómicos, biomarcador, México.

approximately one hundred and fifty chromosomal regions with a 30% classification error and 20% false positives was obtained through supervised grouping.

Conclusions: Multiple loci with and without previous reports of aggressive prostate cancer association were found. Due to small sample size a more extensive analysis should be carried out to confirm association of those regions with prostate cancer aggressiveness.

Keywords: Aggressive prostate cancer, genomic microarrays, biomarker, Mexico.

■ INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en el varón y ocasiona cerca de 6% de las muertes por cáncer a nivel mundial (OMS, GLOBOCAN, 2008).¹ El CaP según su agresividad clínica y grado de invasión se puede clasificar en no agresivo (crecimiento lento, poca o nula actividad metastásica y alta supervivencia) y agresivo (progreso rápido, metastásico y escasa o nula supervivencia después de cinco años de su diagnóstico). Los estadios iniciales de esta patología representan un reto clínico, debido a la carencia de biomarcadores disponibles para definir una posible evolución tumoral, para definir el pronóstico y para guiar las decisiones terapéuticas.

■ OBJETIVO

Identificar *loci* asociados con una evolución agresiva o no agresiva de CaP detectable en tumores primarios para el desarrollo de un perfil genómico de biomarcadores del tejido prostático que permitan la clasificación de CaP en agresivo o no agresivo en pacientes con CaP en etapas iniciales y de diagnóstico reciente.

■ MÉTODOS

Se realizó un análisis retrospectivo de ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas en muestras de ADN genómico aislado de tejido prostático embebido en parafina de pacientes con CaP agresivo (con metástasis mínima a hueso) (n = 15) y no agresivo (más de cinco

años de diagnóstico de CaP sin evidencia aparente de metástasis) (n = 8) usando la técnica de microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH). La plataforma de hibridación está constituida por 3052 clonas de BACs únicas diseñadas para detectar desbalances en el número de copias a lo largo del genoma nuclear humano. Para el análisis de resultados se recurrió al agrupamiento no supervisado (centroídes k-promedio) y supervisado (centroídes reducidos) por medio del software R, función r- bioconductor y para validar los resultados se implementó la prueba de validación cruzada.

■ RESULTADOS

El agrupamiento no supervisado no evidenció correlación alguna entre los datos obtenidos por aCGH y la agresividad del CaP (**Imagen 1**).

Con el agrupamiento supervisado se pudieron observar *loci* anteriormente reportados asociados a CaP agresivo, como ganancias en 5p15.33, 8q24.21 y 16p13.3, donde se localizan los genes TERT, MYC y SSTR5 respectivamente y regiones perdidas donde se localizan genes como CAV-1, EPB41L3, DACH1; entre otras regiones que aún no han sido reportadas. La mejor clasificación es obtenida en un grupo de aproximadamente 150 regiones cromosómicas; en la **Imagen 2** se observan 20 regiones representativas.

La prueba de validación cruzada revela valores elevados en el error de clasificación (30%) y la tasa de falsos positivos (20%). Sin embargo, es importante recalcar que el tamaño de muestra es pequeño y como consecuencia, la mala clasificación de sólo un paciente

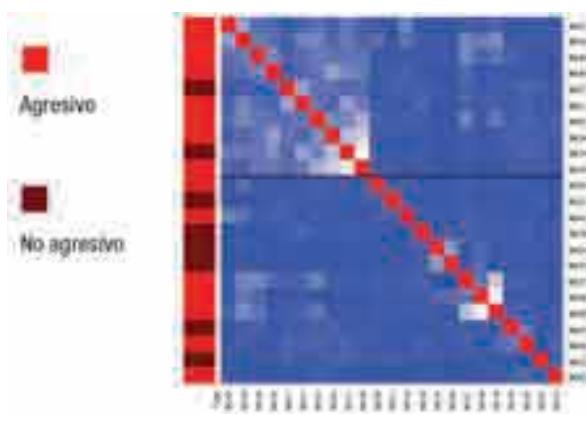


Imagen 1. Agrupamiento no supervisado sin evidencia de correlación entre aCGH y la agresividad de CaP.



Imagen 2. Clonas de CaP, agresivo y no agresivo.

durante el proceso de validación cruzada viraría los resultados de significativos ($p < 0.03$) a no significativos ($p > 0.05$). En la **Tabla 1** se observa un ejemplo característico de una corrida de clasificación sin (**Tabla 1a**) y con (**Tabla 1b**) significancia estadística. Nuestro sistema clasificador calcula la probabilidad de que el CaP sea agresivo ($P[\text{CaPa}]$) y no agresivo ($P[\text{CaPna}]$) para cada uno de los pacientes, de esta forma si $P[\text{CaPa}] > 0.05$ el paciente se clasifica como CaP agresivo y si $P[\text{CaPna}] > 0.05$ el paciente se clasifica como CaP no agresivo donde $P[\text{CaPa}] + P[\text{CaPna}] = 1$. En la parte izquierda de la **Tabla 1** se encuentran todos los pacientes diagnosticados con CaP agresivo y su clasificación determinada por nuestro sistema; por ejemplo, en la **Tabla 1b** de 15 muestras de CaP agresivo, nuestro

clasificador detecta 13 muestras como CaP agresivo y dos como no agresivo (parte izquierda de la imagen), la prueba exacta de Fisher confirma una $p < 0.03$ a diferencia de la **Tabla 1a** cuya $p > 0.05$

■ DISCUSIÓN

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con reportes previos de ganancia y pérdida de genes asociados a CaP agresivo, como en los trabajos de Baird (2010) y Marian (2010) quienes proponen la ganancia del gen TERT y Sun (2007) e Ishkanian (2009), quienes postulan que existe una asociación en la ganancia del proto-oncogen MYC y la pérdida del gen supresor de tumor NKX3-1 con CaP de agresividad moderada y alta.²⁻⁵

■ Tabla 1a. Pacientes diagnosticados con CaP agresivo. Sin significancia estadística.

$p > 0.05$	Agresivo	No agresivo	Real
Agresivo	12	3	15
No agresivo	4	4	8
Predicción	16	7	23

■ Tabla 1b. Pacientes diagnosticados con CaP agresivo. Con significancia estadística.

$p < 0.03$	Agresivo	No agresivo	Real
Agresivo	13	2	15
No agresivo	3	5	8
Predicción	16	7	23

Tambien se encontraron ganancias en varios *loci* donde se localizan genes cuya sobreexpresión ha sido asociada a una modalidad más agresiva y metastásica de CaP como SSTR5, FAM84B, DDEF1: Morichetti (2010); Halmos (2000); Ghoussaini (2008); Lin (2008),⁶⁻⁹ pérdida de *loci* con genes asociados a CaP agresivo como CAV-1, EPB41L3, DACH1: Di Vizio (2009); Wong (2007); Bernkopf (2008); Wu K (2009)¹⁰⁻¹³ y pérdida del *loci* 14q32, región rica en genes también relacionados con la respuesta inmune (Rose 2010).¹⁴ También se corroboraron los resultados obtenidos por Ghoussaini (2008) y van Duin (2005),¹⁵ quienes postulan a la región 8q como una de las regiones más frecuentemente alteradas en CaP, encontrándose amplificada especialmente en CaP agresivo. Por lo anterior, podemos inferir que a pesar del alto grado de heterogeneidad del CaP, existen ciertas regiones de pérdida y ganancia dentro del genoma que se pueden asociar con su agresividad. Se está ampliando el número de muestras de este trabajo para confirmar los hallazgos mencionados.

■ CONCLUSIÓN

El uso de aCGH permitió una caracterización global inicial de las alteraciones genómicas presentes en tejido prostático tumoral. El tamaño de la muestra es pequeño para generar un clasificador significativo que discrimine entre CaP agresivo y no agresivo. Un análisis más extenso podrá confirmar las asociaciones que se sugieren en este estudio y la definición de posibles marcadores genómicos que identifiquen tumores agresivos, para ajustar las modalidades terapéuticas a las necesidades del paciente y mejorar su calidad de vida.

BIBLIOGRAFÍA

- Organización Mundial de la Salud (OMS) GLOBOCAN 2008 (IARC) Section of Cancer Information (17/8/2010).
- Baird DM. Variation at the TEST locus and predisposition for cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2010 May 18;12:e16.
- Marian CO, Wright WE, Shay JW. The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells. *Int J Cancer*. 2010 Jul 15;127(2):321-31.
- Suñ J, Liu W, Adams TS, et al. **DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies.** *Prostate* 2007;67:692-700.
- Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *Prostate* 2009;69:1091-100.
- Morichetti D, Mazzucchelli R, Santinelli A, et al. **Immunohistochemical expression and localization of somatostatin receptor subtypes in prostate cancer with neuroendocrine differentiation.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:511-22.
- Halmos G, Schally AV, Sun B, et al. High expression of somatostatin receptors and messenger ribonucleic acid for its receptor subtypes in organ-confined and locally advanced human prostate cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2564-71.
- Ghoussaini M, Song H, Koessler T, et al. Multiple Loci With Different Cancer Specificities Within the 8q24 Gene Desert. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:962-6.
- Lin D, Watahiki A, Bayani J, et al. ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer Res* 2008;68:4352-9.
- Di Vizio D, Morello M, Sotgia F, et al. **An absence of stromal caveolin-1 is associated with advanced prostate cancer, metastatic disease and epithelial Akt activation.** *Cell Cycle* 2009;8:2420-4.
- Wong SY, Haack H, Kissil JL, et al. Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:12784-9.
- Bernkopf DB, Williams ED. Potential role of EPB41L3 (protein 4.1B/Dal-1) as a target for treatment of advanced prostate cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Jul;12(7):845-53.
- Wu K, Katiyar S, Witkiewicz A, et al. **The cell fate determination factor dachshund inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer cellular growth.** *Cancer Res* 2009;15:3347-55.
- Rose AE, Satagopan JM, Oddoux C, et al. **Copy number and gene expression differences between African American and Caucasian American prostate cancer.** *J Transl Med* 2010;22:70.
- van Duin M, van Marion R, Visser K, et al. High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44:438-49.