

## SESIONES CIENTÍFICAS

---

### EPIGENÉTICA EN CÁNCER DE MAMA

#### Estudio multicéntrico de validación del estado de metilación del gen PITX2 para predicción de riesgo en pacientes con cáncer de mama "N0" tratadas con tamoxifeno en muestras en parafina

Dra. Astrid Margossian

En representación del EpiBreast Group

---

#### RESUMEN

**Introducción:** En un estudio reciente con *microarrays* hemos reportado que la metilación del gen PITX2 correlaciona con el riesgo de recurrencia luego de tamoxifeno adyuvante. Se presentan resultados de un gran estudio multicéntrico para validar al gen PITX2 como factor de predicción de evolución en pacientes con tratamiento adyuvante con tamoxifeno, usando muestras en parafina.

**Métodos:** Se desarrolló una PCR en tiempo real para testear metilación de PITX2 en muestras en parafina. Luego se analizaron 422 tumores de 9 centros, axilas negativas tratadas con tamoxifeno monoterapia. Ninguna paciente fue incluida en los estudios previos.

**Resultados:** En la cohorte independiente el gen PITX2 correlacionó fuertemente con la evolución. (Cox proporcional  $p=0,025$ ). En el grupo con baja metilación del PITX2 (45% de la cohorte) 98% de las pacientes estaban libres de metástasis, comparado con el 85% del grupo hipermetilado.

**Conclusiones:** Este estudio valida la metilación del PITX2 como factor de predicción de evolución luego de adyuvancia con tamoxifeno. Junto con los estudios preliminares, ya se han estudiado 750 pacientes, usando dos métodos diferentes. En todos los estudios la metilación del gen PITX2 estuvo asociada a peor evolución. Estos resultados proveen evidencia sustancial que la metilación de ADN del PITX2 se podría utilizar en la rutina clínica, para predecir evolución en pacientes axila negativa, tratadas con tamoxifeno.

**Palabras clave:** Cáncer de mama. Metilación de ADN. Factor de predicción. Gen PITX2.

#### SUMMARY

**Background:** In hormone receptor positive, node-negative breast cancer, many patients receive chemo-endocrine therapy although endocrine therapy alone would have been sufficient in view of their excellent prognosis. Here, we present results from a large multicenter study initiated to validate PITX2 methylation as an outcome predictor for adjuvant tamoxifen using paraffin-embedded tumor tissue.

**Methods:** A real-time PCR assay was developed to test PITX2 methylation in paraffin-embedded tissue. Matched frozen and embedded samples (n=89) were analyzed to ensure comparability of results. Then, we analyzed paraffin-embedded tumors of 422 node-negative patients from 9 clinical centers treated with tamoxifen alone; none of the patients had been included in the prior studies.

**Results:** In the group with low PITX2 methylation (45 % of the cohort), 98 % of the patients were metastasis-free after 10 years, compared to only 85 % in the group with high PITX2 methylation. In a multivariate model, PITX2 methylation added significant information to conventional factors such as tumor size, grade, and age.

**Conclusions:** This study validates PITX2 methylation as outcome predictor after adjuvant tamoxifen. In all studies, PITX2 methylation was consistently associated with poor outcome. The results provide substantial evidence that PITX2 DNA methylation is suitable for routine clinical use in order to predict outcome in node-negative, tamoxifen-treated patients.

**Key words:** Breast cancer. DNA methylation. Outcome predictor. PITX2 gen.

## INTRODUCCIÓN

La metilación es un fenómeno que ocurre en el ADN. Se lo considera un proceso epigenético; o sea que ocurre por fuera de las bases del ADN, pero que interfiere en su función.

De las cuatro bases fundamentales del ADN la adenina, la timidina, la guanina y la citosina (A, T, G, C), la que se metila siempre es la citosina, que es la que se une con la guanina. La adición del grupo metilo a la citosina ocurre en las citosinas seguidas por guaninas en el contexto CpG.

Cuando la citosina de una región promotora de un gen se encuentra metilada, inactiva la expresión de este gen. Es como un interruptor *on-off*, si está metilada o no metilada. Cuando las citosinas (C) se encuentran metiladas no puede unirse el factor de transcripción en la región promotora, y eso hace que ese gen se transforme en inactivo. La no unión de un factor de transcripción es uno de los mecanismos de regulación, hay otros mecanismos como la acetilación, etc. (Figura 1).

Los patrones de metilación aberrantes en los genes, son una alteración temprana y frecuente en cáncer (en todo tipo de cánceres). Está asociada al tipo de tumor, pronóstico y respuesta a distintos medicamentos.

Existen algunas ventajas de la metilación del

ADN, como que los patrones se mantienen estables, y que por ejemplo se pueden analizar en muestras en parafina, además de muestras congeladas, lo que permite la realización de estudios retrospectivos, así como prospectivos.

¿Qué es la técnica de PCR? PCR es la reacción en cadena de la enzima polimerasa. Es una técnica de amplificación. Se puede tomar una pequeña porción de ADN que se quiere estudiar; por ejemplo, un gen. Esto se hace a través de un cultivo, se calienta, se enfría a distintas temperaturas y la enzima polimerasa puede reproducir ese sector del ADN millones y millones de veces. Amplifica el sector de ADN que se desea estudiar.

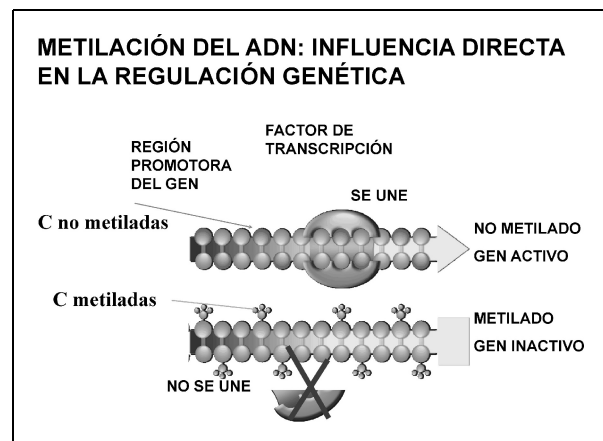


Figura 1

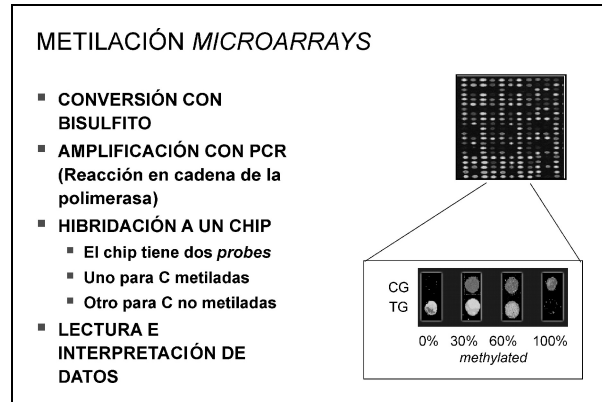
El estado de metilación de los genes no es visible para las técnicas basadas en la amplificación por PCR. Para ello se necesita un tratamiento especial con bisulfito, para que se puedan llegar a ver las C metiladas y no metiladas luego de una reacción de PCR. Básicamente luego de este tratamiento las citosinas no metiladas se transforman en uracilos y la PCR en timidinas, mientras que las citosinas metiladas permanecen igual.

Luego de la conversión con bisulfito, se realiza amplificación del gen con PCR. Luego de la amplificación se pueden utilizar diferentes técnicas para analizar la metilación como, por ejemplo, hibridación a un chip, secuenciar o cuantificación con PCR en tiempo real (*real time-PCR*). De esta manera se puede realizar la lectura y análisis de los datos (Figura 2).

¿Cómo fue el proceso para descubrir, en este caso el PITX2, pero también otros biomarcadores? Se toman las muestras, se eligen cientos de candidatos que puedan servir como biomarcadores. De esos cientos de candidatos quedan decenas de candidatos luego de las validaciones. Esto se prueba con más de cientos de muestras de pacientes para verificar realmente, según la hipótesis, que son candidatos para biomarcadores y con esto se puede desarrollar un chip. Luego de realizar un *ranking* bioinformático de los biomarcadores, se pueden identificar de 1 a 10 biomarcadores. De esta manera se desarrollan marcadores para, por ejemplo, un test en sangre o un test en orina.

### **Cuestiones clínicas y objetivos generales de la investigación**

A muchas pacientes con cáncer de mama "N0" hormono-dependientes se les indica actualmente quimioterapia como tratamiento adyuvante. La pregunta que queremos investigar en este estudio es: ¿cuáles pacientes tendrían buen pronóstico siendo tratadas con hormonoterapia solamente, por ejemplo con tamoxifeno?



**Figura 2**

Entre los objetivos de este trabajo, está el de identificar el grupo de pacientes con supervivencia libre de metástasis > 90% a 10 años. En este grupo de pacientes el beneficio absoluto de la quimioterapia sería pequeño y podría no estar justificada la adición de quimioterapia a la endocrinoterapia u hormonoterapia.

### **Estudios previos y descubrimiento del marcador**

Hubo estudios previos al que vamos a presentar ahora, que permitieron llegar al estudio actual. El primer estudio fue el descubrimiento de los marcadores, donde se estudiaron 109 pacientes con cáncer de mama, todas tratadas con monoterapia con tamoxifeno, en muestras congeladas. Se estudiaron 117 genes candidatos en un microchip. De esos 117 genes que se habían elegido como candidatos, el gen PITX2 correlacionó fuertemente con la supervivencia libre de metástasis en estas pacientes. En el segundo estudio se realizó la validación inicial del gen PITX2 como un marcador, junto con el estudio de otros genes candidatos. Para ello se incluyeron 236 pacientes de cinco centros clínicos, todas tratadas con tamoxifeno monoterapia, en muestras congeladas. Como resultado, se pudo ver nuevamente la correlación del gen PITX2 con pacientes con una menor supervivencia libre de

metástasis cuando está hipermetilado, comparado con el grupo de mayor supervivencia donde el gen está hipometilado ( $p=0,008$  estadísticamente significativo).

¿Qué es el gen PITX2 (*PITX2 Paired-like homeodomain transcription factor 2*)? Es un factor de transcripción relacionado con genes específicos hipofisarios, con proteínas de hipófisis, pero hasta ahora no se había descrito una relación con cáncer de mama.

### Objetivo del presente estudio

En el presente estudio el objetivo es: desarrollar un test para la determinación de PITX2 en tejidos en parafina; confirmar su *performance* en una cohorte de pacientes; e identificar el punto de corte o *cut-off* óptimo, para la separación de grupos de alto riesgo y de bajo riesgo. Para ello se desarrolló una PCR en tiempo real, para ver el estado de metilación del gen PITX2.

Primero se realiza la conversión con bisulfito, donde las C no metiladas se transforman en uracilo (T) y conserva las C metiladas. Luego se realiza una cuantificación de la metilación determinando porcentajes de C metiladas y no metiladas con PCR en tiempo real. Los *primers* utilizados son para regiones no metiladas. La detección específica de la metilación se realiza por hibridación competitiva con dos *probes* diferentes, de distinto color (Figura 3).

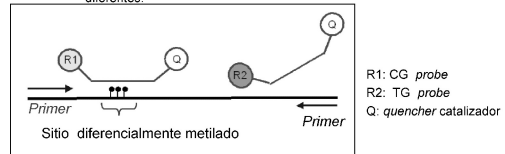
En la Figura 4 se ven los resultados de un estudio previo donde se buscó la *performance* en la determinación en tejido en parafina. Demostró una alta reproducibilidad técnica. Se realizó la determinación tres veces en 150 muestras de cáncer de mama en parafina.

La alta concordancia entre tejido de archivo y el tejido fresco, era otro problema. ¿El tejido fresco que se utiliza corresponde al mismo sector que la parafina? Se confirmó que había un coeficiente de correlación suficiente y confiable.

En otra prueba se analizó la variabilidad entre diferentes secciones del tumor; del mismo tu-

### PCR EN TIEMPO REAL: método de medición del estado de metilación del PITX2

- Paso 1: Conversión del ADN con bisulfito
  - Convierte las C no metiladas a U (T)
  - Conserva las C metiladas
- Paso 2: Cuantificación de la metilación del ADN
  - Determinar porcentaje de C metiladas y no metiladas por PCR en tiempo real.
    - *Primers* fuera de las regiones metiladas (no metilación específicos)
    - Detección específica de la metilación por hibridación competitiva con dos *probes* diferentes.



epibreast group

Figura 3

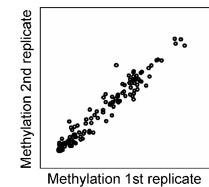
mor se tomaron varias muestras. Esto fue en un diseño experimental, 30 muestras de cáncer de mama, secciones de diferentes partes del mismo tumor y se comparó la metilación en cada una de las partes del mismo tumor. La variabilidad entre secciones es baja en comparación con las diferencias que hay entre individuos (Figura 5).

### MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio clínico actual se realizó con 429 pacientes de nueve centros clínicos, operadas entre 1990 y 1999, con al menos 5 años de seguimiento. Todas tratadas con monoterapia ad-

### PERFORMANCE EN LA DETERMINACIÓN EN TEJIDO EN PARAFINA

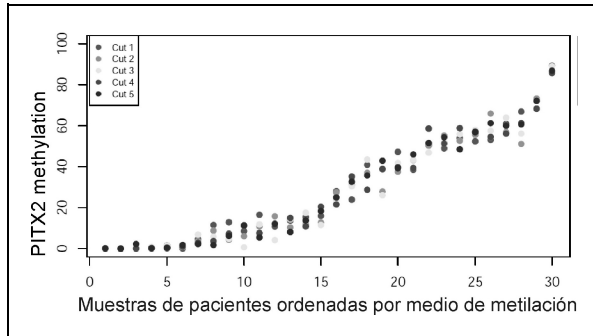
- Demostró una alta reproducibilidad técnica
  - 150 muestras de cáncer de mama
  - En parafina
  - Tres repeticiones técnicas por muestra
  - Spearman's  $\rho=0,95$



- Alta concordancia entre tejido de archivo / tejido fresco
  - 89 pares
  - Spearman's  $\rho 0,81$  (correlation coefficient)

epibreast group

Figura 4



**Figura 5.** Variabilidad entre diferentes secciones tumorales.

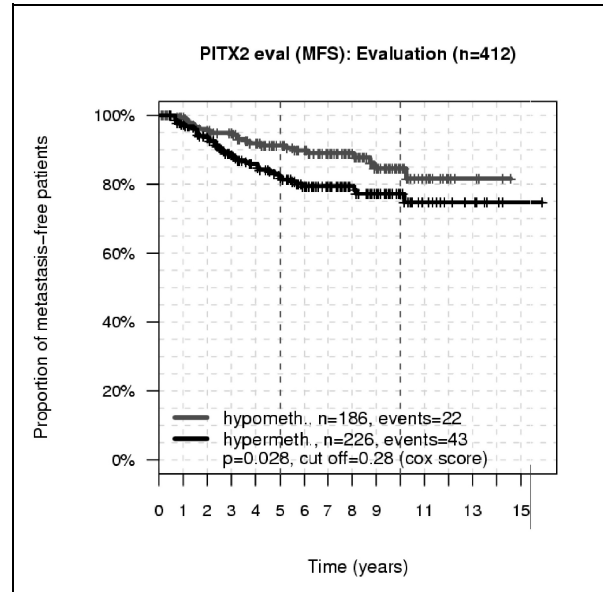
yuvante con tamoxifeno, y una media de seguimiento de 63 meses. La sobrevida libre de enfermedad a 10 años fue de 81,9% y la sobrevida libre de metástasis a 10 años del 90,2%.

Se tomaron tres secciones de 10  $\mu\text{m}$  por tumor, que fueron utilizadas para el análisis. No hubo limitaciones en porcentaje de células tumorales. La histología fue confirmada centralmente por un solo patólogo.

La amplificación por PCR fue posible de las 429 pacientes, en 411 casos; lo cual da una tasa de éxito de 95,8%.

## RESULTADOS

Se dividieron las pacientes hipometiladas e hipermetiladas tomando la mediana como corte, o sea a la mitad, 205 y 206 casos. En las primeras hubo 6 eventos de progresión de enfermedad y en las segundas (hipermetiladas) 15 eventos. Las pacientes que presentan el gen poco metilado demostraron una mayor sobrevida libre de metástasis que las hipermetiladas. En la otra curva se buscó optimizar el punto de corte por técnicas estadísticas (*Cox score*), resultando hipometiladas 181 pacientes e hipermetiladas 230 pacientes. Las pacientes hipometiladas presentaron un 98% de sobrevida libre de metástasis a 10 años (3 eventos) y un 85% las pacientes que estaban hipermetiladas (18 eventos). Con un valor de "p" estadísticamente significativo.



**Figura 6.** Evaluación del componente de pronóstico.

Otro trabajo (que se presentó un poco antes del actual en el congreso de la Asociación Americana para la investigación del cáncer AACR 2005) evaluó el componente de pronóstico del gen PITX2. Aquí se estudiaron 412 pacientes de un grupo independiente; sin ninguna terapia adyuvante; con material congelado; utilizando los mismos *cut-off* que se usaron para el otro estudio. El gen PITX2 demostró que tiene un fuerte componente de pronóstico. No sólo marca una respuesta al tamoxifeno, sino que el hecho de que esté metilado, marca un componente de pronóstico significativo (Figura 6).

## CONCLUSIONES

En todos los estudios el gen PITX2 hipermetilado en cáncer mamario se asocia con una peor evolución. En conjunto con los estudios previos se analizaron más de 750 pacientes. Es posible su uso en la clínica para predecir la evolución de pacientes axila negativa tratadas con tamoxifeno. La medición cuantitativa de la metilación del PITX2 tuvo una excelente *performance* en las muestras embebidas en parafina.

El PITX2 identifica un subgrupo de pacientes con buena evolución luego de tamoxifeno como único tratamiento adyuvante. La metilación del PITX2 tiene un fuerte componente de pronóstico, más allá de su componente de predicción de respuesta.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Martens J, Nimmrich J, Koenig T, LookM, Harbeck N., Olek A, Maier S, Foekens J. et al. Epigenetic signature predicts failure of endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. 26<sup>th</sup> Annual San Antonio Breast Cancer symposium. 2003; abstract 313.
2. Nimmrich I, Hartmann O, Schwoppe I, Maier S, Lesche R., Harbeck N, Paradiso A, Martens J, Cufer T, Margossian A, Spyrtatos F, Eppenberger S. DNA methylation of TFF1 predicts outcome in breast cancer alone and in combination with PITX2. AACR Meeting Abstracts, Apr 2005.
3. Martens J, Maier S, Schwoppe I, Koenig T, Hartmann T, Harbeck N, Portengen H, Foekens J, Nimmrich I, et al. DNA-hypermethylation of PITX2 and risk of breast cancer recurrence in lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. AACR Meeting Abstracts, Apr 2005; 650.
4. Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(3): 223-31.

### DEBATE

**Dr. Núñez De Pierro:** El trabajo es muy interesante, porque cada vez tenemos más evidencia además, que las pacientes hormono-dependientes, fuertemente hormono-respondedoras, tratadas simultáneamente con quimioterapia, no es que no andan mejor, sino que pueden andar peor. Entonces tener un método que distinga claramente aquellas que se van a resolver exclusivamente con hormonoterapia me parece excelente. Una observación, que la respuesta vino al final, seguramente un estudio en que la muestra es pequeña. Pero seguramente el estudio por presentarse, si tiene tal vez 2 ó 3 veces el número de pacientes y convalida esto, puede llegar a ser una herramienta sumamente útil.

**Dra. Margossian:** Justamente eso fue una de las cosas que se habló en el congreso anterior; que habría que validarlo en otros laboratorios independientes y con un mayor "n" de pacientes.

**Dr. Staringer:** Quería saber por qué la amplificación de la PCR fue solamente en 411 de las 429 pacientes, ¿qué pasó con el resto?

**Dra. Margossian:** No fue factible. No se pudo conseguir buena calidad de ADN, buena calidad de muestra por cuestiones técnicas.