

◆ REVISIÓN

Genética y epigenética del cáncer colorrectal

María Laura Pellegrini,¹ Pablo Argibay,¹ Daniel E Gómez²

¹ Unidad de Medicina Molecular y Genómica, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental; ² Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

Acta Gastroenterol Latinoam 2011;41:247-261

Resumen

Las influencias genéticas, epigenéticas y los factores de la dieta juegan un rol fundamental en el inicio y progresión del cáncer dado que a partir de ellos se producen las desregulaciones metabólicas. Más específicamente, el cáncer colorrectal (CCR) es una patología influenciada por los hábitos alimentarios y, además, ya se han establecido alteraciones genéticas y epigenéticas que lo producen. Dentro del CCR encontramos síndromes hereditarios (síndrome hereditario no poliposo y poliposis adenomatosa familiar), los cuales presentan mutaciones en la línea germinal (*hMLH1*) y también alteraciones en la metilación de los promotores, y casos esporádicos, en los que el ambiente y los hábitos de cada individuo, la epigenética, definen en parte el inicio y desarrollo de la neoplasia. Por lo tanto, la epigenética se encuentra instaurada como otro camino de la carcinogénesis. Es de suma importancia definir factores que predigan el CCR en sus inicios, ya que es una patología más bien silenciosa que se observa a nivel clínico en una etapa avanzada.

Palabras claves. Cáncer colorrectal, epigenética, metilación, impronta genómica, inestabilidad microsatélite.

Genetic and epigenetic of colorectal cancer

Summary

Genetic and epigenetic influences as well as dietary factors play an important role in the initiation and progression of cancer. More specifically, colorectal cancer (CRC) is influenced by dietary habits and it has

been established that genetic and epigenetic changes are involved in the carcinogenesis. Within the CRC are hereditary syndromes (hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis), which present germ line mutations on specific genes like *hMLH1* and also changes on promoter's methylation, and sporadic cases, where the environment and individual's habits, both major components of epigenetics, partly define the initiation and development of cancer. Therefore the epigenetic is established as another way of carcinogenesis. Identify the factors that would predict the beginning of CRC is critical, as it is a rather silent disease which is observed clinically at an advanced stage.

Key words. Colorectal cancer, epigenetic, methylation, genomic imprinting, microsatellite instability.

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las afecciones malignas más frecuentes en el hombre. El 5% de las personas desarrollará cáncer en los próximos años, afectando de igual forma a hombres y mujeres. En Argentina el CCR es la tercera causa de muerte por cáncer, siendo la primera el cáncer de pulmón y la segunda el de próstata. El 10% de las muertes por cáncer en nuestro país se producen por CCR. Una de sus características principales es que evoluciona sin síntomas durante un largo tiempo, lo que la hace una enfermedad ideal para la prevención. Los síntomas aparecen como lesiones avanzadas y el pronóstico del paciente depende del estadio de los pólipos.¹

Actualmente el CCR es una patología que involucra cambios genéticos y epigenéticos. Los cambios genéticos pueden ser somáticos y germinales y definen los dos patrones observados: los síndromes esporádicos y los hereditarios. Los casos esporádicos cubren el 75% a 80% y son el resultado de una

Correspondencia: María Laura Pellegrini
E-mail: maria.pellegrini@yahoo.com.ar

acumulación de mutaciones somáticas en oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN. Dichas mutaciones probablemente son el resultado de factores de la dieta y ambientales, así como el envejecimiento. Se desarrollan en personas sin antecedentes familiares y mayores de 50 años. Los casos hereditarios se presentan en el 10% de los casos totales. Dentro de ellos encontramos la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome hereditario no poliposo (HNPCC o síndrome de Lynch). La PAF se caracteriza por presentar cientos de pólipos que aparecen tempranos en edad. Este síndrome posee un carácter autosómico dominante dado que se produce por la mutación en el gen APC. Este gen codifica a una proteína citoplasmática que regula a la β -catenina. La β -catenina actúa principalmente como activador de la transcripción. En condiciones normales, cuando el epitelio colónico permanece intacto y no es necesaria la proliferación celular, la mayor parte de la β -catenina se encuentra formando un complejo proteico. El gen APC induce la fosforilación y la degradación de la β -catenina no ligada al complejo, lo que hace que las concentraciones de esta proteína libre en la célula sean bajas. La pérdida del gen APC provoca la acumulación de β -catenina citoplasmática libre que sufre translocación hacia el núcleo, donde activa la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. Por lo tanto, el gen APC cumpliría el rol de gen supresor de tumores. El HNPCC se caracteriza por presentar mutaciones germinales en los genes que componen la maquinaria de reparación del ADN (*hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hPMS1* y *hPMS2*). Dicha maquinaria constituye un complejo enzimático que corrige los errores que se producen durante la replicación. Cuando se encuentra uno de los genes mutados la maquinaria de reparación no funciona y se producen mutaciones, dando como resultado la inestabilidad microsatélite (MSI) característica de esta patología. Además de encontrarse mutaciones en los genes de la maquinaria MMR, se han observado metilaciones anormales a lo largo de sus promotores, provocando el silenciamiento génico.² Los casos esporádicos de CCR presentan dicha metilación y los casos hereditarios forman parte de la teoría de Kundson, la cual establece que es necesario un segundo golpe al alelo normal para que se produzca el cambio en el fenotipo. El primer golpe viene dado por una mutación en la línea germinal y el se-

gundo por metilaciones a nivel de los promotores.³

Hoy en día no solo los cambios genéticos que se producen en el genoma dan inicio a las desregulaciones observadas en las células tumorales. La epigenética ha tomado cada vez mayor importancia en el inicio y desarrollo de las neoplasias e involucra los cambios que se producen en el genoma y en la cromatina que no afectan la secuencia de nucleótidos. A nivel del genoma las metilaciones se producen en los dinucleótidos CGs y a nivel de la cromatina se producen acetilaciones y desacetilaciones sobre las colas de las histonas. Dichas modificaciones dan como resultado la activación de oncogenes o la represión de genes supresores de tumores, provocándose un desbalance en el metabolismo celular. Dentro de la epigenética también encontramos genes que presentan impronta genómica (IG). Se denomina IG al silenciamiento específico de uno de los alelos parentales. La expresión diferencial de uno de los dos alelos es el resultado de metilaciones en las zonas que regulan la expresión génica.

La epigenética se encuentra influenciada por las condiciones ambientales y por los componentes de la dieta. Los factores ambientales pueden modificar las metilaciones predeterminadas del genoma alterando la expresión génica y las variaciones en los componentes de la dieta pueden alterar las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de aminoácidos, de ácidos nucleicos y del principal dador celular de metilos, la S-adenosilmetionina (SAM).

Por lo tanto, los mecanismos genéticos no son el único camino que lleva al cáncer. Los cambios epigenéticos están siendo cada vez más considerados como alternativas a las mutaciones y las alteraciones cromosomales en el bloqueo de la función génica. Saber que el cáncer también ocurre mediante alteraciones epigenéticas que no alteran la secuencia de nucleótidos da lugar a un grupo muy importante de afectados: aquellos que padecen cáncer esporádico, en quienes no es una mutación en la línea germinal lo que produce la patología sino un cambio que se produce a lo largo de la vida. En el presente trabajo haremos una revisión de los últimos avances en la epigenética del CCR.

Epigenética

La etiología del término "epigenética" es la siguiente: *epi* significa "en" o "sobre" y *genética* significa "raza" o "generación". En conjunto puede-

mos decir que epigenética significaría "en o sobre los genes". Conrad Waddington, genetista ligado al estudio de la evolución y el desarrollo, fue el primero que acuñó en 1942 el término "*epigenética*" como *la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo*. Hasta 1950 el término epigenética se usaba de forma diferente, refiriéndose a todos los eventos del desarrollo que llevan de un cigoto fertilizado al organismo maduro.^{4,5} Actualmente se encuentra la siguiente definición: *cambios reversibles y heredables que se producen en el ADN dando como resultado la expresión diferencial de los alelos de un gen*.⁶

Los cambios que se producen a nivel del ADN son las metilaciones en zonas específicas del genoma y las modificaciones en la cromatina. En las bacterias la metilación está asociada a la identificación de cepas y también es utilizada para distinguir el ADN replicado del que no lo está aún. En eucariotas cumple diversas funciones tales como regulación de la transcripción, inactivación del cromosoma X, mantenimiento de la estructura cromosómica y silenciamiento del ADN parasítico. El 2% al 7% de las citosinas se encuentran metiladas en el ADN de los mamíferos.⁷

Existen regiones en las que la densidad de los dinucleótidos CGs es baja, representados por un 80% del total. Éstas se encuentran normalmente metiladas y se localizan en los exones, en regiones no codificantes y en zonas de ADN repetitivo. La metilación de dichas zonas cumple la función de silenciar la transcripción de regiones no codificantes, lo que previene la expresión de elementos repetitivos del ADN y del ADN parásito que es una amenaza para la integridad del genoma.

Las islas CpG son regiones que presentan una alta densidad de dinucleótidos CGs. Representan el 1% del genoma y se las encuentra en las zonas 5' de aproximadamente la mitad de los genes incluyendo promotores y regiones no transcritas, regulando la expresión génica. En general estas islas CpGs se encuentran no metiladas en células normales menos en el cromosoma X y en los alelos silenciados por la impronta genómica. Estas regiones están frecuentemente asociadas con zonas transcripcionalmente activas, encontrándose las no metiladas.

Las metilaciones en el ADN son catalizadas por metiltransferasas las cuales adicionan un grupo me-

tilo a las citosinas que se encuentran precedidas por la guanina. Hay dos tipos de metiltransferasas: las metilasas de novo y las metilasas de mantenimiento (DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b). Las metilasas de novo metilan el ADN en una nueva posición. Deben reconocer alguna secuencia específica. Las metilasas de mantenimiento actúan constitutivamente sobre sitios hemimetilados para convertirlos en totalmente metilados.⁸

Las modificaciones que se producen en las histonas alteran la expresión génica mediante acetilaciones, desacetilaciones, metilaciones y fosforilaciones. Las acetilaciones se encuentran involucradas en la activación de la expresión génica. El grupo acetilo posee carga negativa y al unirse con la lisina neutraliza la carga positiva de ella. Por lo tanto, la histona se une con menos fuerza al ADN quedando más accesible a la maquinaria enzimática. Las acetiltransferasas de histonas (HAT) son las encargadas de acetilar las histonas. La desacetilación provoca el efecto contrario, se produce la unión más fuerte entre el ADN y las histonas y es catalizada por las desacetilasas de histonas (HDAC). Las metilaciones son catalizadas por las metiltransferasas de histonas (Dnmts) y ocurren sobre los residuos lisina y arginina de las colas proteicas de las histonas, generando una cromatina más compacta y menos accesible. A diferencia de las acetilaciones, la metilación incrementa la afinidad de residuos básicos por el ADN. La metilación en la lisina 9 de la histona H3 se encuentra asociada a ADN silenciado y está globalmente distribuida en las regiones heterocromáticas como los centrómeros y telómeros.⁹

La deacetilación se encuentra relacionada con la metilación ya que la HDAC es reclutada por las DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b. Además, en algunos casos la actividad de la HDAC requiere el reconocimiento de sitios CpG previamente metilados. Al mantenerse la acetilación durante la mitosis se piensa que dicho patrón de acetilación representa una impronta epigenética heredable que puede influenciar a la transcripción génica. Esto se ha confirmado inhibiendo la deacetilación con la droga trichostatina (TSA) y provocando la expresión del alelo que se encuentra normalmente silenciado debido a la impronta genómica del gen IGF2, tanto en células humanas como murinas. También se observó la disminución de la metilación del ADN en las células tratadas indicando que la acetilación y la metilación del

ADN se encuentran relacionadas en la regulación del proceso de impronta genómica.¹⁰

La fosforilación de las histonas tiene lugar durante la división celular y se produce en sus cuatro tipos. En determinadas fases del ciclo celular se encuentran determinadas histonas fosforiladas que favorecen la condensación de la cromatina. Además, la fosforilación se encuentra involucrada en la transcripción donde la histona H3 se fosforila y se establece una competencia transcripcional en la respuesta temprana de genes como Fos o Jun. Una pequeña fracción de las histonas H3 acetiladas son fosforiladas, lo que indica que esta modificación contribuye a la activación de genes por estimulación de la actividad HAT en la misma histona. De modo que esta acetilación y fosforilación simultánea en la H3 en los loci de los genes Fos y Jun da lugar a la activación de la transcripción. En general se la encuentra asociada a un aumento de la actividad transcripcional. La cantidad de residuos diferentes que pueden ser modificados en las histonas y la combinación de dichas modificaciones han dado lugar al concepto de "código de histonas".¹¹ El código de histonas, a través de la diversidad de las modificaciones en los aminoácidos de las histonas, provee información adicional para la expresión génica, creando sitios de unión a determinadas proteínas que van a provocar una conformación de la cromatina activa o inactiva dependiendo el caso. Por ejemplo, la metilación en la lisina 4 y en la lisina 14, así como la fosforilación de la serina 10 en la histona H3, han sido asociadas con la activación génica.¹²

Impronta genómica

La impronta genómica (IG) se define como el silenciamiento específico de uno de los alelos parentales, dicho silenciamiento se produce por metilaciones específicas en determinadas zonas del gen, resultando en una marca en la línea germinal que se transmitirá a la descendencia.

Actualmente se han identificado, mediante análisis computacionales, 156 genes que posiblemente presentan IG.¹³

El grupo de Esfstratiadis y col fue el primero en demostrar que un gen normal de mamífero presentaba dicha característica, cuando observaron que un ratón que había heredado el alelo paterno defectivo del gen IGF2, gen involucrado en el crecimen-

to celular, presentaba retraso en el crecimiento, mientras que cuando el alelo defectivo era el materno, el ratón presentaba un crecimiento normal. Esto daba a suponer que la dosis materna no estaba involucrada en el desarrollo normal del ratón y solo lo estaba la dosis paterna.¹⁴

La IG se establece durante la gametogénesis y se mantiene tras la fecundación y durante la formación del embrión. De esta forma se expresan los alelos correspondientes para el correcto crecimiento del embrión. Cuando se inicia en el embrión el desarrollo de las células germinales primordiales se produce el borrado de todas las marcas y se establecen en el desarrollo de las gametas maduras en función del sexo del nuevo individuo. De este modo, la IG heredada del progenitor de idéntico sexo al del organismo en crecimiento se elimina y vuelve a sellarse en la línea germinativa de ese embrión, pero los heredados del progenitor del sexo opuesto no se vuelven a marcar una vez eliminados. La IG materna se produce durante la maduración de los ovocitos y la IG paterna se produce en la línea germinativa masculina antes de la meiosis.¹⁵

La expresión de los genes que presentan IG es constante, a menos que un cambio genético o epigenético ocurra. Si éste ocurre, se produce el desbalance de la expresión monoalélica produciéndose la expresión bialélica o el silenciamiento bialélico. A este estado se lo conoce como pérdida de la IG.

Se han observado desregulaciones de la IG en diferentes genes y en diferentes tipos de cáncer. A continuación se van a detallar los genes más importantes reportados en la literatura en los cuales se ha observado pérdida de la IG en cáncer colorrectal.

IGF2, pérdida de la impronta genómica y cáncer colorrectal

Los factores de crecimiento tipo insulina se encuentran involucrados en la regulación de la proliferación celular. Al grupo lo conforman dos factores IGF1 e IGF2, dos receptores de superficie (IGF1R y IGF2R) y seis proteínas de alta afinidad (IGFBP1 al IGFBP6). El gen IGF2 codifica a un factor de crecimiento que actúa de forma autocrina y paracrina, su importancia en el tejido tumoral se debe a sus funciones mitogénicas y antiapoptóticas mediadas por su receptor, el IGF2R.^{16,17}

El gen IGF2 se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 11p15.5, presenta 9 exones y el péptido maduro está constituido por los exones 7, 8 y 9. El gen IGF2 es transcrito por 4 promotores diferentes (P1 al P4) resultando en varias proteínas de diversos pesos moleculares. Los promotores P2, P3 y P4 contienen islas CpGs y su transcripción está sujeta a la IG, mientras que el promotor P1 se utiliza principalmente en el hígado adulto y no presenta IG, por lo tanto ambos alelos se encuentran en actividad.¹⁸ Se ha observado que los promotores P2-P4 ganan metilaciones con el envejecimiento. Inicialmente se observa la metilación normal en el alelo materno, pero a medida que se analizan muestras de mayor edad se encuentran los promotores metilados en el alelo paterno. Esto no sucede en el promotor P1 que permanece con actividad. Éste es un claro ejemplo de cómo las células empiezan a cambiar su metabolismo mediante cambios epigenéticos. El envejecimiento provoca un aumento en la metilación del alelo activo provocando su silenciamiento, pero el proceso debe ser dirigido ya que el promotor P1 permanece sin modificaciones.¹⁹

El gen IGF2 fue el primer *locus* en el cual se observó la característica de expresión alélica diferencial. Primero el hallazgo fue en ratón y luego se lo caracterizó en humanos.^{20,21} A partir de allí y al estar involucrado en la proliferación celular fue que se lo empezó a estudiar como posible integrante en el proceso de carcinogénesis. Nos vamos a detener en los estudios que se han hecho en el CCR.

Los primeros trabajos que empezaron a sugerir a la IG como mecanismo potencial de una patología fueron realizados en los síndromes de Beckwith-Wiedemann y en el síndrome de Prader Willi, confirmando luego que la pérdida de la IG del gen IGF2 formaba parte del inicio y progresión de dichos síndromes.²²⁻²⁴ El síndrome de Beckwith-Wiedemann presenta una predisposición a generar tumores embrionarios tales como el tumor de Wilms, los cuales a su vez se caracterizan por la pérdida de la heterocigosidad (LOH) del cromosoma 11p15.5. LOH implica la pérdida de material genético. Estas deleciones a veces involucran la pérdida de la totalidad de un determinado gen, así como de sus regiones flanqueantes. Si uno de los alelos se encontraba ya delecionado, desaparece la heterocigosis, por lo que decimos que ha habido LOH. Se ha demostrado que el 69% de los tumores de Wilms que

no presentaban LOH en el cromosoma 11p presentaban expresión bialélica del gen IGF2, sugiriendo que la pérdida de la IG es un nuevo mecanismo epigenético en la carcinogénesis.²⁵

Uno de los primeros trabajos en el cual analizaron el estado de la IG del gen IGF2 en CCR fue el de Kinouchi y col, en el cual encontraron un 38% de expresión bialélica.²⁶ Otros trabajos corroboraron estos resultados encontrando un 33% de pérdida de la IG del gen IGF2 en CCR, confirmando los resultados mediante inmunohistoquímica.²⁷

Por lo tanto, la desregulación de la IG del gen IGF2 se encuentra involucrada en el CCR. Además, la pérdida de la IG se ha encontrado con una alta frecuencia en la mucosa normal de pacientes con CCR, indicando que es una alteración que ocurre de forma temprana en la carcinogénesis. En el mismo estudio encontraron también pérdida de la IG en sangre periférica de cuatro pacientes que presentaban pérdida de la IG del IGF2 en mucosa y tumor.²⁸

Nuestro grupo ha encontrado pérdida de la IG del IGF2 en el 36% de las muestras normales y en el 60% de las muestras tumorales, tres de las cuales presentaron expresión bialélica en mucosa y tumor, sugiriendo que la mucosa se encontraba en un período de cambio hacia un fenotipo maligno. Otras tres presentaban pérdida de la IG del IGF2 en tejido tumoral y no en mucosa, sugiriendo que se encontraban en un período menos avanzado (resultados no publicados). Asimismo, encontramos 6% de pérdida de la IG del IGF2 al analizar la sangre periférica de los pacientes. Estos resultados sugieren que además de ser una modificación que ocurre en el inicio del cáncer, puede llegar a ser un cambio a nivel germinal hereditario, sugiriendo al estado de la IG del IGF2 como un marcador predictivo del CCR.^{29,30}

Actualmente se ha establecido que la pérdida de la IG del IGF2 ocurre en el CCR de forma temprana y generalmente en los tumores con localización proximal.³¹ A su vez se la encontró no asociada a los cambios ambientales, insinuando que la pérdida de la IG del IGF2 no aparece como un cambio ambiental adquirido sino más bien se comportaría como un factor de riesgo hereditario.³² Además, un último trabajo evaluó la estabilidad temporal del estado de la IG.³³ Aunque la muestra analizada fue chica, sus autores encontraron que la mayoría de los individuos tenían un estado de la IG similar a lo

largo del período examinado y, además, no encontraron una asociación significativa con el rango de edades, sugiriendo que la pérdida de la IG del IGF2 no es un fenómeno adquirido con la edad sino más bien un fenómeno hereditario o congénito.

La ubicación del gen IGF2 es particular ya que se localiza de forma adyacente a la zona promotora del gen H19. Al gen H19 se lo ha caracterizado como un ARN no codificante y cumpliría funciones de gen supresor de tumores. Posee una expresión monoalélica a partir del alelo materno. Junto con el IGF2 se definieron como los primeros genes con IG (Figura 1A).^{34,35} Se ha demostrado que en la expresión de ambos genes interviene una zona regulatoria que define el estado de la IG. A esta zona regulatoria se la denominó Región de Control de la IG (RCIG) y se encuentra dividida por áreas que son propensas a la metilación, llamadas zonas diferencialmente metiladas (DMRs). En ratón, el RCIG se encuentra dividido en 4 regiones mientras que en humanos son 7 los DMRs. Cuando los DMRs se encuentran sin metilar, un factor llamado CTCF se une al RCIG. El CTCF actúa como un aislador transcripcional que coloca límites entre el *enhancer* y los promotores de los genes. Una vez que se une al ADN, éste puede actuar como un represor o un activador dependiendo del sitio de unión. En este caso cuando los DMRs del alelo materno se encuentran sin metilar el CTCF se une y aísla a los *enhancers* del IGF2 y como resultado obtenemos la expresión del H19. Lo contrario ocurre en el alelo paterno, allí obtenemos la expresión del IGF2. De esta forma se regula la IG de ambos *loci*. A esta regulación se la ha denominado "competencia entre *enhancers*".³⁶

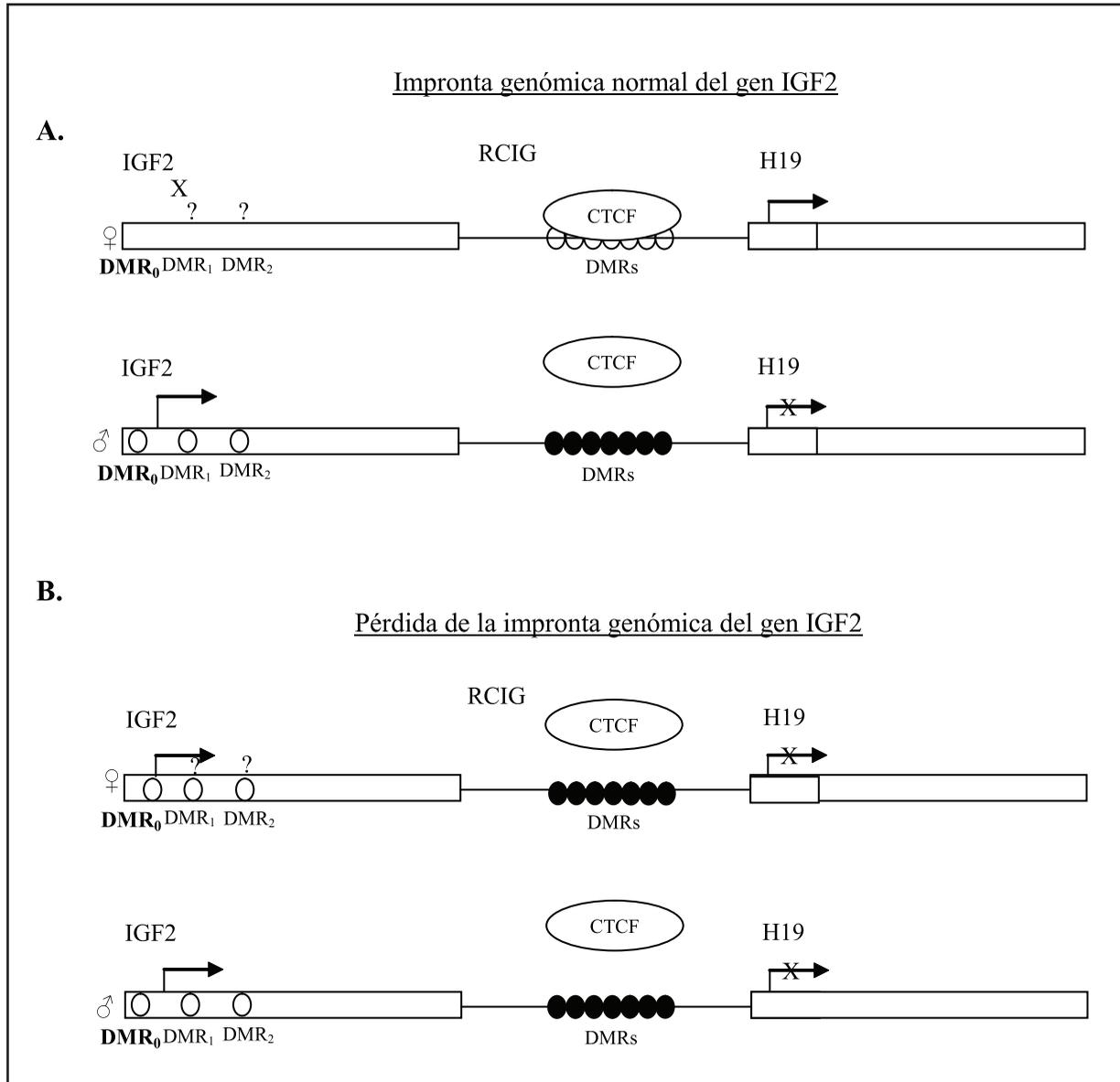
Además, el gen IGF2 presenta DMRs (DMR₀, DMR₁ y DMR₂) en el propio gen que regulan su expresión. El DMR₀ ha sido uno de lo más estudiados y se localiza río arriba del complejo de promotores que se encuentran a partir del promotor P₀. Esta región es homóloga a una región en el alelo materno de ratón que se la ha encontrado metilada (dmr₀).³⁷ Los estudios en humanos encontraron en un principio el mismo patrón de metilación e identificaron pérdida de la metilación del DMR₀ con pérdida de la IG del IGF2, sugiriendo que existen otras zonas que regulan la expresión del gen además de la regulación a partir del RCIG. La desregulación de la IG involucra la expresión bialélica de los tres promotores que presentan IG. Se observó que

estos tres promotores se desreprimen de forma simultánea en el alelo materno. Dado que la diferencia en la metilación se produce río arriba del primer promotor con IG se ha sugerido que dicha región es un centro de metilación que actúa en cis provocando el silenciamiento del alelo (Figura 1B).³⁸ Corroborando estos resultados se ha encontrado hipometilación del DMR₀ en osteosarcoma, en cáncer de mama y en cáncer de ovario, pero sin una asociación con la pérdida de la IG del IGF2, sugiriendo que existiría un mecanismo independiente de desregulación de la expresión (IG).³⁹⁻⁴¹ El grupo de Cui y col encontró pérdida de la IG del IGF2 asociado con la hipometilación del DMR₀ del IGF2 más que con el estado de metilación del H19, sugiriendo que en CCR el DMR del IGF2 es más importante para el mantenimiento de la IG que el RCIG.⁴² Estos resultados implican que los mecanismos de regulación de la IG pueden llegar a ser independientes del modelo de competición por *enhancer*. Probablemente la IG de esta región se encuentre regulada por los DMRs presentes en el propio IGF2 más que los situados entre ambos genes.

Se ha postulado el estado de metilación de dicha zona como un posible indicador predictivo del cáncer, ya que encontraron que la hipometilación del DMR₀ posee mayor prevalencia que la pérdida de la IG y que en el 36% de los casos los CCR presentan hipometilación del DMR₀ con una expresión monoalélica del mismo.⁴³

La desregulación de la IG es una característica ya establecida no solo en el cáncer humano sino también en otras patologías. En el CCR, la pérdida de la IG del IGF2 constituye un primer paso en la carcinogénesis, provocando un desbalance en la proliferación celular. Las causas que provocan los cambios en la metilación en las zonas diferencialmente metiladas son diversas y pueden ser producidas por mutaciones en las proteínas que mantienen el patrón de metilación o bien por factores externos. La proliferación celular bajo condiciones de stress puede resultar en cambios genéticos y epigenéticos permanentes. Se ha observado en cultivos primarios expuestos a dichas condiciones que el perfil de expresión de la totalidad de los genes se encontró estable, salvo los genes que presentan IG, los cuales se vieron modificados con su silenciamiento génico.⁴⁴ Por lo tanto, son variados los factores que producen la desregulación de la IG.

Figura 1. Regulación de la expresión del gen IGF2.



A. Impronta genómica normal del gen IGF2. Normalmente la IG del gen IGF2 se regula a partir de la región de control de la IG (RCIG), la cual se encuentra dividida por siete zonas diferencialmente metiladas (DMRs). En el alelo materno dicha región se encuentra sin metilar por lo que el factor CTCF puede unirse, aislando al promotor del gen IGF2 de los enhancers y permitiendo la expresión del gen H19. En el alelo paterno dicha zona se encuentra metilada impidiendo la unión del CTCF y permitiendo la expresión del gen IGF2. Además, se ha observado que la expresión del gen IGF2 no se encuentra regulada únicamente por el RCIG, sino también por zonas diferencialmente metiladas (DMR0) localizadas cerca de sus promotores. **B.** Pérdida de la impronta genómica del gen IGF2. Al producirse la metilación anormal en la RCIG del alelo materno, el factor CTCF no se puede unir por lo que se permite sobreexpresión del gen IGF2 junto con el silenciamiento del gen H19. Por otro lado, se debe observar hipometilación del DMR0. Los círculos representan los DMRs, cuando se encuentran de color negro significa que están metilados, de lo contrario es una zona no metilada. La flecha representa la expresión de los genes, cuando se encuentra con una x significa que el gen no se está expresando.

Pérdida de la IG del gen IGF2 e inestabilidad microsatélite

Los microsatélites son repeticiones en tandem de secuencias simples de nucleótidos que aparecen a lo largo del genoma humano. Las repeticiones involucran de dos a seis dinucleótidos. Se les han adjudicado funciones en la organización de la cromatina,

en la regulación de los procesos metabólicos del ADN y en la regulación génica.⁴⁵ La maquinaria de replicación es propensa a deslizarse en las regiones que contienen a los microsatélites produciéndose mutaciones. Si dichas alteraciones no son reconocidas y reparadas por la maquinaria de reparación de errores (MMR), se originan adiciones o deleciones

en las repeticiones de los microsatélites, resultando en un cambio en el tamaño de los mismos en las células hijas. A dicho cambio se lo denomina inestabilidad microsatélite (MSI). Por lo tanto, MSI es una situación en la cual un alelo microsatélite en la línea germinal gana o pierde unidades de repetición y, por lo tanto, cambia su longitud somática.⁴⁶

Los principales integrantes del sistema MMR en los cuales se han observado mutaciones son las proteínas hMLH1 y hMSH2. La pérdida de función de dichas proteínas resulta, además de la MSI, en una acumulación de mutaciones somáticas generalizada a lo largo del genoma, en oncogenes y genes supresores de tumores que juegan un papel fundamental en la iniciación y progresión del cáncer.⁴⁷

La MSI es una característica temprana que se observa en el CCR y constituye un indicador de la expansión clonal típica de la neoplasia ya que la alteración puede ser detectada solo si muchas células fueron afectadas por el mismo cambio. El fenotipo MSI en el síndrome de Lynch requiere de una doble inactivación bialélica de los genes de la maquinaria MMR. La primera inactivación involucra la mutación en la línea germinal, la segunda inactivación se puede dar por tres mecanismos posibles: mutaciones somáticas, LOH o una alteración epigenética. El cambio a nivel del epigenoma se da a través de la metilación del promotor del gen hMLH1 provocando su silenciamiento.⁴⁸ En el CCR esporádico la MSI se presenta en el 15% de los casos y ocurre a través de la metilación del promotor de ambos alelos del hMLH1.⁴⁹

En 1997 el Instituto de Cáncer de los Estados Unidos estableció un panel de 5 marcadores de microsatélites (Bat 26, Bat 25, D2S123, D5S346 y D17S250) para determinar el grado de MSI en tumores. Si se encuentra inestabilidad en dos o más microsatélites, se lo denomina MSI-H, si se encuentra en solo un microsatélite se lo denomina MSI-L, y si no se encuentra inestabilidad en ningún microsatélite, se lo denomina MSS.^{50,51} Para la detección de los casos MSI-H se ha observado que solamente con el análisis del microsatélite Bat-26 o del Bat-25 es suficiente para detectar la mayoría de los casos inestables.⁵²

Los tumores MSI-H presentan características particulares como exhibir una mayor prevalencia en el colon proximal, poseen un fenotipo pobremente diferenciado, son diploides, a diferencia de los MSS que presentan aneuploidía, y cambian rápidamente de pólipos benignos a malignos. Se los ha encontra-

do asociados a una sobrevida más larga que los tumores MSS o MSI-L y se ha sugerido que el pronóstico favorable se debe a que los tumores con MSI-H son más sensibles a la quimioterapia.⁵³

Por lo tanto, la MSI está directamente relacionada con las alteraciones epigenéticas que se observan en las células neoplásicas, dado que la metilación de los promotores de los genes del sistema MMR es una característica asentada en el inicio y desarrollo del CCR. Es posible que así como se produce esa metilación aberrante se produzcan metilaciones anómalas en otros sitios, por ejemplo, en los sitios de regulación de la IG. En este caso estaríamos pensando que la pérdida de la IG ocurriría antes o de forma simultánea con la MSI. De lo contrario el estado MSI ocurre primero y a partir de esa desestabilización que se observa en todo el genoma también se desestabilizan los procesos de regulación de la IG. Diferentes trabajos han encontrado asociaciones significativas entre la pérdida de la IG y MSI, como por ejemplo, el grupo de Nishihara y col y el grupo de Cui y col encontraron pérdida de la IG del gen IGF2 en el 91% de los casos con MSI y en el 12% de los casos con MSS.^{27,54}

Dado que en los casos esporádicos MSI se presenta en el 16% al 37% del total y la mutación somática del gen hMLH1 solo aparece en el 16%, se han planteado otros factores genéticos o epigenéticos que afectarían a otros *loci* conllevando al estado de inestabilidad, como por ejemplo alteraciones en genes que codifican a factores de la cromatina pueden afectar la replicación del ADN y, por ende, la fidelidad en la IG provocando MSI y pérdida de la misma.

Nakagawa y col observaron que la mayoría de los casos esporádicos MSI (+) con pérdida de la IG del gen IGF2 presentaban hipermetilación de los promotores hMLH1 y p16. Una minoría de los MSS presentaban pérdida de la IG del gen IGF2 (4/37, 11%) y además metilación del p16, indicando que la metilación del p16 está fuertemente asociada con la pérdida de la IG aún en los casos MSS. Por lo tanto, estaríamos observando que el fenotipo metilador no solo afecta al p16 y al hMLH1, sino también a la región de control de la IG del IGF2, resultando en su desregulación.⁵⁵

Ohta y col encontraron que las muestras de CCR que presentaban la IG normal del gen IGF2 se localizaban en el colon distal, mientras que los CCR con pérdida de la IG del gen IGF2 se localizaban en el colon proximal (22,7% Vs. 56,6%), sugiriendo

otra característica que comparte con los casos MSI.³¹

Lo mismo encontraron Sasaki y col: muestras con pérdida de la IG del gen IGF2 y que presentan características similares a los MSI sin hallar una asociación significativa entre ambos.⁵⁶ Estos autores sugieren que la pérdida de la IG del gen IGF2 se encuentra involucrada en el desarrollo del CCR, pero debe pertenecer a otro camino distinto.

Por lo tanto, hacen falta más investigaciones para determinar si existe una asociación entre estas dos características. Aunque el IGF2 no participa del conjunto de genes que presentan la característica CIMP (+), a este *loci* se lo encuentra metilado produciéndose su expresión bialélica. Dicha metilación se debe estar produciendo por un camino diferente al de los CIMP.

p57^{Kip2} (CDKN1C) y cáncer de colon

El ciclo celular se regula por una serie de proteínas conocidas como ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (CDK) e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI). En conjunto dichas proteínas coordinan la secuencia de transiciones del ciclo celular. La actividad de las cinasas dependen de su unión con la ciclina apropiada, por lo tanto, las ciclinas actúan como reguladores positivos de su actividad. Los CDKIs actúan como reguladores negativos y juegan un rol importante en la progresión del ciclo celular.

A los CDKIs se los ha agrupado de acuerdo a su estructura y a los distintos blancos que poseen. Encontramos dos clases en la literatura, la clase INK4 (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}), los cuales inhiben solo a las subunidades catalíticas CDK4 y CDK6, y la segunda clase la familia Cip/Kip, los cuales son capaces de inhibir la progresión del ciclo celular uniéndose e inhibiendo a los complejos CDKs de la fase G1, las ciclinas D, E y A. A dicha familia la componen los siguientes inhibidores: p21^{Cip1}, p27^{Kip1} y p57^{Kip2}.⁵⁷ Dada la función del gen p57^{Kip2} su pérdida contribuiría a una acelerada proliferación celular.

La proteína p57^{Kip2} fue localizada en el núcleo y se observó que presentaba una expresión tejido específica a diferencia de los otros dos integrantes (p21^{Cip1} y p27^{Kip1}).⁵⁸

Cuando se iniciaron los estudios del gen p57^{Kip2} se encontraron diferencias significativas en su expresión entre muestras de tumor y mucosa normal, pero al no hallar mutaciones puntuales del gen en el

tejido tumoral, se empezó a sugerir que probablemente la diferencia observada se podría deber a modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales, además de proponer que el gen presentaría IG.^{59,60}

La IG del gen p57^{Kip2} fue confirmada primero en ratón, donde encontraron que el alelo paterno se encontraba reprimido y metilado. En ratón el gen mapea en la región distal del cromosoma 7 en un cluster de genes con IG que incluyen al IGF2, el H19 y el Mash2.⁶¹ Luego fue caracterizado el mismo *locus* en humanos, localizándose en el cromosoma 11p15.5 y se observó que también presentaba IG, expresándose el alelo materno de forma preferencial, pero se vio que la IG no era absoluta, el alelo paterno se expresa en bajos niveles en algunos tejidos y a niveles comparables con el alelo materno en tejido cerebral fetal y en algunos tejidos embrionarios.⁶² De los CDKIs, el p57^{Kip2} es el único que presenta impronta genómica.⁶³

A partir de que se confirmó que el gen p57^{Kip2} es un gen que presenta IG y que además se localiza en una zona que se encuentra frecuentemente alterada en cáncer, fue que se inicio el estudio de su expresión en diversas neoplasias y se llevaron a cabo algunos trabajos en el CCR.⁶⁴

Diversos trabajos han hallado irregularidades en la expresión del gen p57^{Kip2}. Por ejemplo, en el tumor de Wilms se encontró una ausencia total de la proteína en tejido tumoral al compararlo con la mucosa normal.⁶⁵ En cáncer hepático también se encontró una disminución significativa en la expresión del p57^{Kip2} y dicha disminución fue vinculada con una alta agresividad biológica.⁶⁶ En cáncer de mama y de estómago no se encontraron mutaciones, pero los niveles de ARNm estaban significativamente disminuidos.⁶⁷ Estos resultados sugieren que las alteraciones epigenéticas son de mayor importancia que las mutaciones en la inactivación de la expresión del p57^{Kip2}.

La pérdida de la IG del gen p57^{Kip2} se ha observado en cáncer de cabeza y cuello, encontrándose un 13% de pérdida de IG, mientras que en la mucosa normal correspondiente a cada tumor se observó expresión monoalélica.⁶⁸

En CCR no se han llevado a cabo muchos estudios. Se ha encontrado una correlación significativa entre la baja expresión de p57^{Kip2} y el tamaño del tumor. Además, se demostró que la proteína aumenta su expresión de la mucosa normal a adenomas pero disminuye la misma cuando pasa de adenoma a car-

cinoma primario sugiriendo que la pérdida del p57^{Kip2} ocurre de forma tardía en la carcinogénesis colorrectal.⁶⁹ Estos resultados también han sido observados en tiroides y ovario.^{70,71}

Dentro de los mecanismos de inactivación que se han observado para la pérdida de expresión de la proteína, todos involucran alteraciones en la metilación del genoma. En efecto, se ha observado en líneas celulares gástricas tratadas con inhibidores de HDAC (n-butyric o TSA) una activación de la expresión del ARNm y al tratar con agentes demetilantes (5-aza-2'-deoxycytidina) también se observa un incremento en la expresión. Estos resultados sugieren que el gen p57^{Kip2} se inactivaría por la formación de heterocromatina con las HDAC y también estaría involucrada la metilación del promotor.⁷² Además, se observó metilación en islas CpGs que se encuentran en la región de inicio de la transcripción de líneas celulares de CCR y cuando se las trató con 5-azacitidina se restableció su expresión. También se observó en el mismo estudio, mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-H3 y H4, el estado de deacetilación de las histonas que presentaban la región promotora metilada, corroborando la hipótesis de que la metilación genómica y la deacetilación de histonas juegan un rol importante en el silenciamiento del p57^{Kip2}.⁴⁸

Epimutaciones

Se llaman epimutaciones a las metilaciones hemialélicas que se producen en la línea germinal de un gen. El término epimutación se empezó a definir cuando un estudio encontró un paciente que presentaba la mayoría de los signos para definir un HNPCC, pero sin la mutación germinal del gen hMLH1. Al analizar el estado de metilación del promotor del hMLH1 hallaron hipermetilación de uno de los alelos en sangre periférica y en tejido tumoral. Lo que había desencadenado la neoplasia fue la inactivación del alelo normal.⁷³ Al no poseer muestras de sangre periférica de familiares del paciente los investigadores no pudieron definir la herencia del alelo metilado, pero sí demostraron la existencia de metilaciones que se producen en otros tejidos no siendo neoplásicos. La transmisión vertical se demostró cuando encontraron la epimutación en los espermatozoides de un paciente que presentaba múltiples tumores, todos con deficiencias del sistema MMR, pero sin mutaciones en los mismos.⁷⁴ Encontraron la metilación hemialélica en sangre pe-

riférica, en folículos capilares y en mucosa bucal dando por sentado que era una alteración somática. Aunque encontraron que el alelo metilado era de origen materno, al estudiar a la madre y a otros parientes no encontraron la misma variación sugiriendo que la epimutación apareció *de novo*.⁷⁵ Hitchins y col también demostraron la transmisión vertical en una familia a partir de una paciente que presentaba la epimutación somática. Dos de sus hijos presentaban la epimutación de origen materno, pero ésta había revertido produciéndose la expresión bialélica del hMLH1, mientras que el tercer hijo también había heredado el alelo materno, pero no se había producido la reversión, estando con un alto riesgo de perder la expresión monoalélica del gen. De este último portador se estudiaron sus espermatozoides y estaban libres de la epimutación.⁷⁶ Aparentemente el proceso normal de la gametogénesis permite la corrección de la epimutación mediante el borrado que se produce de las metilaciones de los genes que presentan IG en las células germinales primordiales. Esto se observa en los hijos que no presentan la hemimetilación, pero sí heredaron el alelo materno y también se observa en las células germinales del individuo que mantuvo la hemimetilación. En este último caso se refleja una resistencia a la reprogramación a través de un incompleto borrado o de una retención de la memoria epigenética. Por lo tanto, las epimutaciones aparentan ser reversibles entre generaciones, presentando una herencia no mendeliana.

Metabolismo del folato y cáncer colorrectal

La epigenética, a través de la metilación del ADN, forma parte del inicio y de la progresión del CCR. El metabolismo del folato es el principal camino para la obtención de los sustratos para la metilación del ADN y se encuentra restringido principalmente por los componentes de la dieta. Estudios migratorios en los cuales se ha observado que las personas que migran de países con bajo riesgo de CCR a países en donde el riesgo es superior adoptan en una o dos generaciones el riesgo del país al cual emigraron. En dichos estudios la principal característica fue el cambio en la dieta. Las condiciones ambientales pueden conferir diferentes actividades a los mismos genes. A partir de aquí se encuentra una relación entre la epigenética y los factores nutricionales.⁷⁷

La reserva monocarbonada de la célula es muy importante ya que de ella depende la síntesis de los

aminoácidos, de las purinas, de las pirimidinas y la generación de la metionina. Todas estas moléculas son vitales para la mayoría de los caminos metabólicos y su producción depende exclusivamente de lo que obtiene la célula del medio externo. Para que la unidad de carbono sea transferida en la síntesis de las moléculas, ésta debe ser activada por un transportador. Por lo tanto, la reserva monocarbonada comprende las unidades de carbono unidas a determinados transportadores. Los principales transportadores del carbono son el folato y la S-adenosilmetionina (SAM).

La SAM es un compuesto de alta energía formado por la condensación del aminoácido metionina con ATP. Representa el dador principal de grupos metilo para el ADN, ARN, hormonas y neurotransmisores. Por otro lado, la forma activa del folato es la 5, 6, 7, 8 tetrahidrofolato (THF). Tanto el folato como la metionina deben ser obtenidos en la dieta. Por lo tanto, es importante una dieta balanceada que incorpore estos compuestos para que el metabolismo celular funcione normalmente. Las fuentes más ricas de folatos son principalmente las verduras de hojas, las frutas, la levadura y el hígado.⁷⁸ Dado que se han observado en el cáncer variaciones en la metilación del genoma (hipometilaciones e hipermetilaciones), resulta de suma importancia el estudio del metabolismo del folato en el CCR. Se postula que dichos cambios en la metilación del genoma pueden ser producidos en algunos casos por una disminución de estos nutrientes en la dieta.^{79,80} Aunque existe una discrepancia en los resultados obtenidos de los estudios que se han realizado, es fundamental definir si existe una asociación entre el metabolismo del folato y el cáncer, ya que el factor ambiental en las neoplasias esporádicas es principal en la carcinogénesis.

El primer paso del metabolismo del folato es la reducción del folato a THF a través de la enzima dihidrofolato reductasa. Luego una unidad de carbono de la serina o de la glicina es transferida a la THF para formar 5,10 metilene tetrahidrofolato. Este último es utilizado para la síntesis de timidinas, purinas o bien se reduce a 5-metil-THF, mediante la enzima metilene tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). El 5-metil-THF es utilizado para metilar las homocisteínas para formar metionina a través de la metionina sintetasa, las cuales luego se convierten a SAM y son utilizadas para la metilación de ADN.

El metabolismo del folato se puede ver interrumpido a partir de diferentes causas como por ejemplo

disminución de los sustratos, mutaciones en las enzimas involucradas en el proceso o disminución de sus actividades debido a polimorfismos. Se sabe que ciertos polimorfismos presentes en los genes producen la reducción de la actividad de la enzima que van a codificar. Por ejemplo, la MTHFR presenta una variante en la línea germinal que comprende una sustitución de una citosina por una timidina en la posición 677, convirtiendo una alanina a una valina en la secuencia proteica. Dicho cambio resulta en una enzima termolábil con una disminución en su actividad.⁸¹

Se ha reportado que individuos homocigotas para la variante TT presentan un 30% de la actividad enzimática mientras que los individuos heterocigotas CT poseen un 65%.⁸² La reducción de la función provocaría una disminución en el sustrato que se utiliza para metilar la homocisteína y de esa forma generar SAM. De forma teórica se observaría una reducción en el sustrato para la metilación del ADN y, por ende, se produciría una hipometilación del genoma, efecto que se observa en el CCR.

Son varios los trabajos en los cuales se ha asociado una disminución del riesgo a padecer CCR con el genotipo TT de la MTHFR, sugiriendo un efecto protector del alelo T.^{83,84} En un estudio que se realizó con individuos con el síndrome de Lynch que presentaban una mutación confirmada de un gen del sistema MMR y además eran homocigotas para el alelo normal del MTHFR, se observó que desarrollaban CCR más temprano que los individuos con una o dos copias del alelo T, corroborando los resultados de protección del alelo T.⁸⁵ Sin embargo, también se encontraron resultados opuestos a los anteriores en los que el genotipo TT se asocia como factor de riesgo.⁸⁶

El fenotipo metilador (CIMP) es una característica del CCR que involucra la hipermetilación de las islas CpGs de determinados promotores llevando al silenciamiento de la transcripción génica. La metilación anormal del promotor del gen hMLH1 es un ejemplo del grupo CIMP que da lugar a la mayoría de los CCR esporádicos con fenotipo MSI+. Se han observado en diferentes trabajos que los individuos que presentan el genotipo TT de la MTHFR son más susceptibles a desarrollar CCR mediante el camino de la inestabilidad microsatélite^{87,88} y además se ha encontrado hipermetilación del promotor del gen hMLH1 en pacientes que presentaban ese polimorfismo de la MTHFR.⁸⁹

Asimismo, se observó que la relación entre el po-

limorfismo TT y MSI se encuentra influenciada por la adquisición del folato, dado que entre individuos con una adecuada ingesta de folato la combinación de los dos polimorfismos del gen MTHFR (C677T y A1298C) se ha asociado con una disminución del riesgo de CCR. Este efecto protector no se observó en los individuos con baja ingesta de folato. Lo que debe estar ocurriendo es lo siguiente: ante una adecuada ingesta de folato, aunque la actividad de la enzima MTHFR es baja, suficiente cantidad de folato es convertido a 5-metilenetetrahidrolfolato para cubrir las necesidades de los grupos metilo en el metabolismo. Sin embargo, este grupo de investigadores no encontró la misma asociación entre el polimorfismo del MTHFR y el estado MSI. Suponen que la reducida actividad de la MTHFR favorece a la síntesis de ADN y a los sistemas de reparación, disminuyendo la incorporación errónea de uracilos, resultando en tumores estables (MSS).⁹⁰

La metionina sintetasa (MS) forma parte del camino metabólico del folato cumpliendo la función de metilar la homocisteína a metionina, utilizando un grupo metilo donado por la 5-metilenetetrahidrolfolato. El gen de la MS posee un polimorfismo (A919G) en la posición 2756, resultando en un cambio de una asparagina por una glicina en la posición 919 del transcripto, lo que provoca la alteración funcional de la misma.⁹¹ Diversos estudios han encontrado una asociación significativa entre el genotipo GG y una disminución en el riesgo de padecer CCR. Además, se observó un aumento en los niveles de homocisteína y se ha observado que individuos con cáncer que presentan dicho polimorfismo exhiben una reducción significativa de la metilación en regiones CpGs de genes supresores de tumores. De forma teórica la disminución en la actividad de la MS resulta en una merma en el *pool* de SAM, llevando a una reducción en la metilación del ADN.

El efecto protector del polimorfismo se observa en los estadios más avanzados debido a que produce una cierta inhibición del uso de la metionina para el crecimiento tumoral y también una disminución en la hipermetilación de las islas CpGs de los genes supresores de tumores.^{92,93}

La MS puede resultar inactiva debido a la oxidación de su cofactor, la vitamina B12. Para que la MS vuelva a tener actividad depende de la remetilación de la vitamina B12 vía la metionina sintetasa reductasa (MSR).⁹⁴ Se ha observado que variantes alélicas del gen MSR (A66G) generan una enzima con menor afinidad por la MS y se lo ha asociado con una

disminución en el riesgo de CCR.^{95,96} Por lo tanto, no solo un polimorfismo presente en la MS puede alterar su actividad, sino también un polimorfismo presente en una enzima que regula su función. Continuando con esta línea, en otro estudio no encontraron una asociación entre el polimorfismo A919G y el riesgo de CCR, pero sí hallaron una disminución en el riesgo de CCR cuando se presentan los polimorfismos que resultan en una disminución en la actividad de la timidina sintetasa (TS). La disminución de la enzima TS conlleva una disminución en la síntesis de ADN y por ende una reducción en la replicación celular.⁹⁷

Por lo tanto, se podría concluir que, de ser la desregulación del metabolismo del folato una de las causas de la metilación anormal que se observa en las células neoplásicas, no es motivo de un solo polimorfismo presente en las enzimas involucradas en el camino. Se trataría de una interacción génica entre varios polimorfismos o, mejor dicho, del desbalance de varias actividades enzimáticas involucradas en el mismo proceso.

Conclusiones

La epigenética, ya considerada una de las causas del cáncer, nos provee de una herramienta para definir las alteraciones que preceden al inicio de la neoplasia y para predecir el posible hecho de padecerla. El estudio de la impronta genómica del gen IGF2 nos acercó a esta idea cuando inicialmente se observó la desregulación de su impronta genómica en tejido normal adyacente al tumor, sugiriendo que dicho cambio se produjo en el inicio de la carcinogénesis. Asimismo, fue observado en sangre periférica, proponiéndoselo como un cambio a nivel germinal. La pérdida de la impronta genómica funcionaría como un marcador biológico para la detección temprana del cáncer.

Un segundo paso es precisar el mecanismo por el cual se establecen los patrones epigenéticos y determinar las regiones involucradas en el proceso del silenciamiento de un alelo. En el caso del IGF2, se pensó en un principio que la regulación se hallaba solamente en la zona que comparte con el H19. Hoy en día ya se ha establecido que existen otras zonas diferencialmente metiladas en el propio gen que regulan su expresión. En el gen *p57^{Kip2}* la regulación está dada por metilaciones en la zona promotora.

Mediante la utilización de determinadas drogas se pueden revertir las alteraciones epigenéticas ob-

servadas en el tejido. Estas son estrategias que aún están en estudio dado que deben ser dirigidas directamente al tumor sin que afecten las metilaciones normales de otras células. Por lo tanto, en un principio la epigenética nos estaría dando respuestas a un nivel de pronóstico y diagnóstico, pero no de tratamiento.

Los factores de la dieta se encuentran relacionados con la epigenética, afectando el *pool* de los sustratos para la metilación normal del ADN. Se ha demostrado que una buena ingesta de folatos previene el CRC.

Hallar una característica predictiva en un examen de sangre facilitaría el diagnóstico. Además de ampliar las propiedades del tumor con el estado de la impronta genómica y la inestabilidad microsatélite, la presencia de epimutaciones permitiría establecer un pronóstico más acertado de la enfermedad, así como también un tratamiento acorde al estado epigenético del tumor. Eventualmente las alteraciones epigenéticas observadas en los tejidos nos darán un marco de acción para el paciente.

Referencias

1. Matos EL, Loria DI, Zengarini N. Atlas de Mortalidad por Cáncer de Argentina (1997-2001). Departamento de Carcinogénesis Química y Ambiental. Instituto de Oncología "Ángel H Roffo". Buenos Aires, Julio 2003.
2. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-3460.
3. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-823.
4. Waddington CH. Introduction to modern genetics. The MacMillan Company, 1939.
5. Slack JMW. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nature Reviews Genetics* 2002;3:889-895.
6. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* 2006;1:76-80.
7. Fraga MF, Uriol E, Borja Diego LB, Berdasco M, Esteller M, Cañal MJ, Rodríguez R. High performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis* 2002; 23:1677-1681.
8. Partha MD, Rakesh S. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4632-4642.
9. Robert JS, Kenichi N, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics* 2003;11:629-639.
10. Hu JF, Oruganti H, Vu TH, Hoffman AR. The role of histone acetylation in the allelic expression of the imprinted human insulin-like growth factor II gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;20;251:403-408.
11. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293:1074-1080.
12. Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:29-39.
13. Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Research* 2007;17:1723-1730.
14. Efstratiadis A. Parental imprinting of autosomal mammalian genes. *Curr Opin Genet Dev* 1994;4:265-280.
15. Constancia M, Pickard B, Kelsey G, Reik W. Imprinting mechanisms. *Genome Res* 1998;8:881-900.
16. Pollak M. Insulin-like growth factor physiology and neoplasia. *Growth Horm IGF Res* 2000;10 (Suppl A): S6-S7.
17. Pavelic K, Bukovic D, Pavelic J. The role of insulin-like growth factor 2 and its receptors in human tumors. *Mol Med* 2002;8:771-780.
18. Sussenbach JS, Steenbergh PH, Jansen E. Structural and regulatory aspects of the human genes encoding IGF-I and -II. *Adv Exp Med Biol* 1991;293:1-14.
19. Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, Newsham IF, Baylin SB. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:11757-11762.
20. DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991;64:849-859.
21. Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, Goodyer CG, Polychronakos C. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 1993;4:98-101.
22. Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehense V. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 1991;351:665-667.
23. Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 1989;342: 281-285.
24. Cerrato F, Sparago A, Verde G. Different mechanisms cause imprinting defects at the IGF2/H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms tumour. *Hum Mol Genet* 2008;17:1427-1435.
25. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993;362:747-749.
26. Kinouchi Y, Hiwatashi N, Higashioka S, Nagashima F, Chida M, Toyota T. Relaxation of imprinting of the insulin-like growth factor II gene in colorectal cancer. *Cancer Lett* 1996;107:105-108.
27. Takano Y, Shiota G, Kawasaki H. Analysis of genomic imprinting of insulin-like growth factor 2 in colorectal cancer. *Oncology* 2000;59:210-216.
28. Cui H, Horon IL, Ohlsson R, Hamilton SR, Feinberg AP. Loss of imprinting in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Nat Med* 1998;4: 1276-1280.
29. Kawakami K, Ruzsiewicz A, Bennett G. DNA hypermethylation in the normal colonic mucosa of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006;94:593-598.
30. Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003;299:1753-1755.
31. Ohta M, Sugimoto T, Seto M. Genetic alterations in colorectal cancers with demethylation of insulin-like growth factor II. *Hum Pathol* 2008;39:1301-1308.

32. Cruz-Correa M, Cui H, Giardiello FM. Loss of imprinting of insulin growth factor II gene: a potential heritable biomarker for colon neoplasia predisposition. *Gastroenterology* 2004;126:964-970.
33. Cruz-Correa M, Zhao R, Oviedo M. Temporal stability and age-related prevalence of loss of imprinting of the insulin-like growth factor-2 gene. *Epigenetics* 2009;4:114-118.
34. Rachmilewitz J, Goshen R, Ariel I, Schneider T, Groot N, Hochberg A. Parental imprinting of the human H19 gene. *FEBS* 1992;309:25-28.
35. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM: The product of the H19 gene may function as RNA. *Mol Cell Biol* 1990;10:28-36.
36. Kuhn EJ, Geyer PK: Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:259-265.
37. Moore T, Constanca M, Zubair M, Bailleul B, Feil R, Sasaki H, Reik W. Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse *Igf2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12509-12514.
38. Taniguchi T, Schofield AE, Scarlett JL, Morison IM, Sullivan MJ, Reeve AE. Altered specificity of *IGF2* promoter imprinting during fetal development and onset of Wilms tumour. *Oncogene* 1995;11:751-756.
39. Ulaner GA, Vu TH, Li T. Loss of imprinting of *IGF2* and *H19* in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet* 2003;12:535-549.
40. Byun HM, Wong HL, Birnstein EA, Wolff EM, Liang G, Yang AS. Examination of *IGF2* and *H19* loss of imprinting in bladder cancer. *Cancer Res* 2007;67:10753-10758.
41. Murphy SK, Huang Z, Wen Y. Frequent *IGF2/H19* domain epigenetic alterations and elevated *IGF2* expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res* 2006;4:283-292.
42. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of *H19* and *IGF2*. *Cancer Res* 2002;62: 6442-6446.
43. Ito Y, Koessler T, Ibrahim AE. Somatic acquired hypomethylation of *IGF2* in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2008;17:2633-2643.
44. Pantoja C, de Los Rios L, Matheu A, Antequera F, Serrano M. Inactivation of imprinted genes induced by cellular stress and tumorigenesis. *Cancer Res* 2005;65:26-33.
45. De la Chapelle A: Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003;349:209-210.
46. Alonso A, Moreno S, Valiente A, Artigas M, Perez-Juana A, Ramos Arroyo MA. Genetic mechanisms in the hereditary predisposition to colorectal cancer. *An Sist Sanit Navar* 2006;29:59-76.
47. Perucho M. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 2003;22: 2223-2225.
48. Kaz A, Kim YH, Dzieciatkowski S. Evidence for the role of aberrant DNA methylation in the pathogenesis of Lynch syndrome adenomas. *Int J Cancer* 2007;120:1922-1929.
49. Martina L, Veigl L, Kasturi L, Olechnowicz J, Aihong Ma, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Guo-min Li, Drumond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of *hMLH1* by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8698-8702.
50. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58: 5248-5257.
51. Perucho M. Correspondence re: C.R. Boland et al., A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer (*Cancer Res* 1998;58:5248-5257). *Cancer Res* 1999;59:249-256.
52. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997;57:300-303.
53. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-5852.
54. Nishihara S, Hayashida T, Mitsuya K. Multipoint imprinting analysis in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *Int J Oncol* 2000; 17:317-322.
55. Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomaki P, Plass C, Nakamura Y, de La Chapelle A. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of *H19*-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2001;98: 591-596.
56. Sasaki J, Konishi F, Kawamura YJ, Kai T, Takata O, Tsukamoto T. Clinicopathological characteristics of colorectal cancers with loss of imprinting of insulin-like growth factor 2. *Int J Cancer* 2006;119:80-83.
57. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; 13:1501-1512.
58. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of *p57KIP2*, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 1995;9:639-649.
59. Reid LH, Crider-Miller SJ, West A, Lee MH, Massague J, Weissman BE. Genomic organization of the human *p57KIP2* gene and its analysis in the G401 Wilms' tumor assay. *Cancer Res* 1996;56:1214-1218.
60. Orlow I, Iavarone A, Crider-Miller SJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor *p57KIP2* in soft tissue sarcomas and Wilms' tumors. *Cancer Res* 1996;56:1219-1221.
61. Hatada I, Mukai T. Genomic imprinting of *p57KIP2*, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nat Genet* 1995;11:204-206.
62. Hatada I, Inazawa J, Abe T. Genomic imprinting of human *p57KIP2* and its reduced expression in Wilms tumors. *Hum Mol Genet* 1996;5:783-788.
63. Cost GJ, Thompson JS, Reichard BA, Lee JY, Feinberg AP. Lack of imprinting of three human cyclin-dependent kinase inhibitor genes. *Cancer Res* 1997;57:926-929.
64. Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC. Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, *p57^{KIP2}*, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3026-3030.
65. Thompson JS, Reese KJ, DeBaun MR, Perlman EJ, Feinberg AP. Reduced expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene *p57^{KIP2}* in Wilms tumor. *Cancer Res* 1996;56: 5723-5727.

66. Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Monden M, Matsura N. Expression of p57^{KIP2} protein in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2001;61:221-225.
67. Shin JY, Kim HS, Lee KS. Mutation and expression of the p27^{KIP1} and p57^{KIP2} genes in human gastric cancer. *Exp Mol Med* 2000;32:79-83.
68. Lai S, Goepfert H, Gillenwater AM, Luna MA, El-Naggar AK. Loss of imprinting and genetic alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57^{KIP2} gene in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6: 3172-3176.
69. Li JQ, Wu F, Usuki H. Loss of p57^{KIP2} is associated with colorectal carcinogenesis. *Int J Oncol* 2003;23:1537-1543.
70. Ito Y, Yoshida H, Nakano K. Expression of p57^{KIP2} protein in normal and neoplastic thyroid tissues. *Int J Mol Med* 2002;9:373-376.
71. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Expression of p57^{KIP2} and its clinical relevance in epithelial ovarian tumors. *Anticancer Res* 2002;22:3191-3196.
72. Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:262-265.
73. Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002;62:3925-3928.
74. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 2004;36:497-501.
75. Hitchins M, Williams R, Cheong K. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005;129:1392-1399.
76. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007;356:697-705.
77. Kmet J. The role of migrant population in studies of selected cancer sites: a review. *J Chronic Dis* 1970;23:305-324.
78. Hubner RA, Houlston RS. Folate and colorectal cancer prevention. *Br J Cancer* 2009;100:233-239.
79. Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, Ehrlich M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res* 1988;48:1159-1161.
80. Giovannucci E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr* 2002;32(Suppl):2350S-2355S.
81. Chen J, Giovannucci E, Kelsey K. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1996;56:4862-4864.
82. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
83. Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1098-1102.
84. Chen J, Giovannucci E, Hankinson SE. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 1998;19:2129-2132.
85. Pande M, Chen J, Amos CI, Lynch PM, Broaddus R, Frazier M. Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms C677T and A1298C on age-associated risk for colorectal cancer in a caucasian lynch syndrome population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16: 1753-1759.
86. Osian G, Procopciuc L, Vlad L. MTHFR polymorphisms as prognostic factors in sporadic colorectal cancer. *J Gastrointest Liver Dis* 2007;16:251-256.
87. Shannon B, Gnanasampathan S, Beilby J, Iacopetta B. A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 2002;50:520-524.
88. Hubner RA, Lubbe S, Chandler I, Houlston RS. MTHFR C677T has differential influence on risk of MSI and MSS colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2007;16:1072-1077.
89. Kawakami K, Ruzsiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res* 2003;9:5860-5865.
90. Eaton AM, Sandler R, Carethers JM, Millikan RC, Galanko J, Keku TO. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms, folate intake, and microsatellite instability in colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2023-2029.
91. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate-/cobalamin disorders. *Human Mol Genet* 1996;5:1867-1874.
92. Ma J, Stampfer MJ, Christensen B, Giovannucci E, Hunter DJ, Chen J, Willett WC, Selhub J, Hennekens CH, Gravel R, Rozen R. A polymorphism of the methionine synthase gene: association with plasma folate, vitamin B12, homocyst(e)ine, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:825-829.
93. Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, Sanchez-Cespedes M, Herman JG, Esteller M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002;62:4519-4524.
94. Matsuo K, Hamajima N, Hirai T, Kato T, Inoue M, Takezaki T, Tajima K. Methionine synthase reductase gene A66G polymorphism is associated with risk of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002;3:353-359.
95. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3059-3064.
96. Olteanu H, Munson T, Banerjee R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. *Biochemistry* 2002;41:13378-13385.
97. Ulrich CM, Curtin K, Potter JD, Bigler J, Caan B, Slattery ML. Polymorphisms in the reduced folate carrier, thymidylate synthase, or methionine synthase and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2509-2516.