

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de las alteraciones genéticas y epigenéticas de la cadherina E y su expresión en la transcripción en la propensión al cáncer de mama

Andrés Felipe Aristizábal-Pachón¹, Catarina Satie-Takahashi^{1,2}

¹ Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

² Departamento de Biología, Faculdade de Filosofia, Ciências y Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Introducción. La cadherina E (*CDH1*) cumple un papel importante en la transición epitelio-mesénquima y está relacionada con la invasión y las metástasis en varios tipos de carcinomas. Sin embargo, el efecto de las mutaciones y 'epimutaciones' germinales en la propensión al cáncer de mama no es claro.

Objetivo. Evaluar el polimorfismo rs5030625, los cambios en el patrón de metilación del promotor y la expresión en la transcripción del gen *CDH1* en pacientes con cáncer de mama.

Materiales y métodos. Se tomaron muestras de sangre periférica de 102 pacientes con cáncer de mama y 102 mujeres de control. La genotipificación del polimorfismo rs5030625 se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de polimorfismos de longitud del fragmento de restricción; la PCR y el análisis de disociación de alta resolución sensible a metilación se emplearon para determinar el estado y el nivel de metilación del promotor del *CDH1*; por último, el nivel de expresión en la transcripción del *CDH1* se evaluó mediante PCR cuantitativa con transcripción inversa.

Resultados. Los resultados no evidenciaron asociación entre el polimorfismo rs5030625 y el cáncer de mama. Se encontraron perfiles aberrantes de metilación del promotor del *CDH1* en las pacientes con cáncer de mama relacionados con las primeras etapas de desarrollo del cáncer. La disminución de la expresión del *CDH1* se asoció con la presencia de metástasis y el estado de metilación del promotor.

Conclusión. Las alteraciones en el *CDH1* se asociaron con la invasión y las metástasis en el cáncer de mama. Se proporcionó evidencia adicional sobre la relevancia del *CDH1* en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama.

Palabras clave: neoplasias de la mama/genética; cadherinas; reacción en cadena de la polimerasa; polimorfismo de longitud del fragmento de restricción; reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3135>

Effect of genetics, epigenetics and variations in the transcriptional expression of cadherin-E in breast cancer susceptibility

Introduction: Cadherin-E (*CDH1*) is an important regulator of epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in many carcinomas. However, germinal epimutations and mutations effect in breast cancer susceptibility is not clear.

Objective: To evaluate rs334558 polymorphism, promoter methylation status and *CDH1* expression profile in breast cancer patients.

Materials and methods: We collected peripheral blood samples from 102 breast cancer patients and 102 healthy subjects. The identification of rs334558 polymorphism was performed using PCR-RFLP, while methylation-specific PCR (MSP) and methylation-sensitive *high-resolution melting* (MS-HRM) were used to explore *CDH1* methylation status; finally, *CDH1* transcriptional expression profile was evaluated using RT-qPCR.

Results: We found no association between rs334558 polymorphism and breast cancer. Aberrant promoter methylation profile was found in breast cancer patients and it was related with early cancer stages. *CDH1* down-regulation was significantly associated with metastasis and promoter methylation.

Contribución de los autores:

Andrés Felipe Aristizábal-Pachón: recolección de muestras, datos clínicos y de histopatología, ejecución de experimentos y análisis de datos

Los dos autores participaron en la concepción del estudio, el diseño de los experimentos y en la escritura del artículo.

Conclusion: *CDH1* alterations were associated with invasion and metastasis in breast cancer. Our results offer further evidence of *CDH1* relevance in breast cancer development and progression.

Key words: Breast neoplasms/genetics; cadherins; polymerase chain reaction; restriction fragment length polymorphism; reverse transcriptase polymerase chain reaction.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.3135>

La cadherina E es una glucoproteína de transmembrana codificada por el gen de la cadherina (*CDH1*) localizado en el cromosoma 16q22.1; es la proteína de adhesión más importante del epitelio y hace parte del tipo I de las cadherinas “clásicas”. Es responsable por las uniones celulares dependientes de Ca^{2+} , de la vía de adhesión celular homofílica, del desarrollo de la polaridad normal del epitelio y de la arquitectura del tejido (1,2). Además, une el entorno extracelular con el citoesqueleto y, mediante su dominio intracelular, hace parte de las vías de señalización celular con las cateninas, particularmente la p120, la alfa y la beta (3,4).

La cadherina E contiene un solo dominio transmembrana, cinco dominios extracelulares, de los cuales el más próximo a la membrana se caracteriza por presentar cuatro cisteínas conservadas que estabilizan la formación de un fuerte contacto celular mediante enlaces disulfuro, y un dominio citoplásmico que puede dividirse en dos subdominios: uno conservado proximal, generalmente denominado dominio yuxtamembrana, y el otro, el dominio de unión a beta catenina (5). El dominio citoplásmico se une a las cateninas (6). La catenina alfa es una proteína homóloga a la vinculina que se une a la actina. Las interacciones de la cadherina E y la catenina alfa forman la región adherente; estas interacciones son mediadas por la catenina beta, la cual actúa como un adaptador entre ellas (7).

La pérdida de la función adhesiva de la cadherina E es un paso crítico en la progresión de las células epiteliales hacia un fenotipo más agresivo. La cadherina E se reconoce ampliamente como un gen supresor de factores de invasión, ya que su inactivación o la disminución de su función debido a mutaciones, deleciones alélicas o alteraciones epigenéticas (por ejemplo, la hipermetilación del promotor), se asocian con la transición epitelio-mesénquima, lo que conlleva una mayor agresividad

del tumor y un mayor potencial metastásico. La función de la cadherina E se pierde frecuentemente durante el desarrollo del cáncer epitelial humano (8); además, se asocia con la diferenciación y la invasión del tumor, y la metástasis en ganglios linfáticos (2,9). Las alteraciones genéticas y epigenéticas, y los cambios en el nivel de transcripción de la cadherina E, se han asociado con el desarrollo del cáncer de mama (10-13), pero dichos resultados no son concluyentes y, en algunos casos han sido contradictorios.

El cáncer de mama se cuenta entre las enfermedades más comunes en las mujeres de todo el mundo; aproximadamente, 23 % de todos los casos diagnosticados de cáncer se relacionan con la mama. En 2012, su incidencia anual era de 1.677 millones de casos nuevos y 522.000 muertes (14,15). En Brasil, el cáncer de mama ha sido una de las principales causas de muerte desde 1979 (16,17), con 57.120 casos nuevos en el 2014, y un riesgo estimado de 56,1 casos por cada 100.000 mujeres; es el más común en la población femenina y representa el 20,8 % de todos los tipos de cáncer diagnosticados en las mujeres. Este cáncer es la séptima causa de muerte en Brasil, después de las enfermedades cerebrovasculares y la diabetes, supera los otros tipos de cáncer y fue la causa de muerte de 13.345 pacientes en el 2012 (17).

En este contexto, la importancia de una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama es evidente, ya que contribuye a mejorar el diagnóstico y el pronóstico en términos de tiempo y seguridad.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la asociación de las alteraciones genéticas y epigenéticas, y los cambios en la expresión en la transcripción del *CDH1*, con el desarrollo del cáncer de mama en un grupo de casos y un grupo de control.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se tomaron muestras de sangre periférica de 204 mujeres de los hospitales Santa Casa y Hospital de las Clínicas de la ciudad de Ribeirão Preto (SP),

Correspondencia:

Andrés Felipe Aristizábal-Pachón, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Teléfono: (5516) 2101-9368; fax: (5516) 3315-3761
sagipe07@gmail.com y afaristizabal@udca.edu.co

Recibido: 23/11/15; aceptado: 03/05/16

Brasil. Del total, 102 correspondieron a pacientes con cáncer de mama sin importar su edad o la etapa de la enfermedad. La información sobre el estado de los receptores hormonales, el tipo histológico, la edad en el momento del diagnóstico y el estadio según el método de estadificación TNM se obtuvieron de la historia clínica de cada paciente (cuadro 1). El grupo de control estuvo conformado por 102 mujeres sanas, sin historia familiar de cáncer. La información sobre el número de gestaciones, la edad de la menopausia y la menarquia, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos y el tratamiento de reemplazo hormonal, se recopiló mediante un cuestionario específico (cuadro 2).

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN genómico de cada muestra con el kit de purificación Wizard Genomic DNA (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Cada muestra extraída se cuantificó por espectrofotometría en el equipo NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA). Se evaluaron la pureza con las razones 260/230 y 260/280, y la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Cuadro 1. Características generales de las pacientes con cáncer de mama y las del grupo de control

	PCM (N=102)		Controles (N=102)		p
	n	%	n	%	
Edad (años) (media ± DE)	58,16 ± 12,83		53,51 ± 11,52		0,407 ^a
Fumadores					
Sí	23	22,5	24	23,5	0,868 ^b
No	79	77,5	78	76,5	
Edad de menarquia ^c					
≤13	71	69,6	78	76,5	0,269 ^b
>13	31	30,4	24	23,5	
Estado de menopausia					
Sí	86	76,1	75	82,4	0,059 ^b
No	16	23,9	27	17,6	
ACO					
Sí	39	38,2	57	54,5	0,012^b
No	63	61,8	45	45,5	
TRH					
Sí	22	21,6	17	16,7	0,373 ^b
No	80	78,4	85	83,3	
Gestaciones ^c					
≤30	32	31,4	46	45,1	0,075 ^b
>30	50	49,0	35	34,3	
Nulípara	20	19,6	21	20,6	

PCM: pacientes con cáncer de mama

^c: edad en años

ACO: anticonceptivos orales; TRH: tratamiento de reemplazo hormonal. Los valores de p se calcularon mediante: ^a, test de t de Student y ^b, test de ji al cuadrado; los valores de p<0,05 se consideraron significativos y se destacan en negrilla.

Genotipificación

La región promotora del gen *CDH1* presenta el polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) rs5030625, el cual se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP), usando iniciadores que amplifican regiones específicas del promotor del *CDH1*.

Las secuencias de los iniciadores se presentan en el cuadro 3. La PCR se hizo en un volumen total de 20 µl que contenían 100 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada iniciador, 4 nmol de cada dNTP (GE, Fairfield, CT, USA), 2 mM de MgCl₂ y 1 U de *Taq* polimerasa Platinum en solución tampón 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: un ciclo a 95 °C durante dos minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante un minuto, a 64 °C durante un minuto y a 72 °C durante un minuto, finalizando con uno a 72 °C durante cinco minutos.

Cuadro 2. Características clínicas del grupo de pacientes con cáncer de mama (N=102)

Variable	n (%)
Tipo histológico	
CDI	80 (78,4)
Otros	22 (19,6)
Grado del tumor	
I	33 (32,3)
II	40 (39,2)
III	18 (17,7)
IV	11 (10,8)
Tamaño del tumor	
T1	45 (44,1)
T2	40 (39,2)
T3	17 (16,7)
Estado de ganglios linfáticos	
Positivo	57 (36,7)
Negativo	48 (47,1)
Estado del receptor de estrógeno	
Positivo	90 (88,2)
Negativo	9 (8,8)
Sin información	3 (2,9)
Estado del receptor de progesterona	
Positivo	84 (82,4)
Negativo	15 (14,7)
Sin información	3 (2,9)
Estado de HER2/neu	
Positivo	22 (21,6)
Negativo	69 (67,6)
Sin información	11 (10,8)

CDI: carcinoma ductal invasivo; HER2neu: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores y tamaño de los productos de amplificación para la evaluación del polimorfismo rs5030625 y el estado de metilación del gen *CDH1*

	Secuencia	Producto
Reacción en cadena de la polimerasa y análisis de polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (PCR-RFLP)		
rs5030625	F – 5'- CCCC GACTTGTCTCTCTAC - 3' R – 5'- GGCCACAGCCAATCAGCA - 3'	448 – pb
PCR específica para metilación (MSP)		
Metilado	F – 5' - TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT - 3' R – 5' - TAACTAAAAATTCACCTACCGAC - 3'	115 – pb
No metilado	F – 5' - TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT - 3' R – 5' - CACAACCAATCAACAACA - 3'	97 – pb
MS-HRM	F – 5' - GAGTTTGCGGAAGTTAGTTTAGATTTTAG - 3' R – 5' - CGACTCCAAAAACCCATAACTAACC - 3'	
Control de conversión		
Beta actina	F – 5' - TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT - 3' R – 5' - AACCAATAAACCTACTCCTCCCTTAA - 3'	133 – pb

Las diferencias entre las secuencias de los iniciadores y del ADN modificado se muestran en negrilla. Las diferencias entre las secuencias metiladas y no metiladas están subrayadas. F: iniciador directo; R: iniciador inverso; pb: pares de bases

El producto amplificado fue de 447 pb y su digestión se hizo con la enzima de restricción *Ban*II (Fermentas, Waltham, MA, USA), la cual hace cortes en dos posiciones en ausencia del polimorfismo, generando tres fragmentos de 263, 116 y 68 pb, y un corte en presencia del polimorfismo, generando dos fragmentos de 331 y 116 pb. Los productos de la PCR y del análisis de RFLP se visualizaron en gel de agarosa al 2,5 %.

Conversión con bisulfuro

El ADN extraído se sometió a conversión de las citosinas no metiladas en uracilos con el estuche Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), aplicando el siguiente protocolo. El ADN se sometió a desnaturalización y se mezcló con bisulfito de sodio, y después, a ciclos a temperaturas de 95 °C y 65 °C durante dos horas, lo cual permitió que el grupo amino (-NH₂) de todas las citosinas se convirtiera en grupo cetona (=O) y, así, las primeras se convirtieran en uracilos; solo las 5' metilcitosinas no se convirtieron por interferencia electrónica del grupo metilo. Por último, la muestra de ADN se purificó en columnas de separación para retirar la sal y el bisulfito. Como control positivo de la conversión, se amplificó un fragmento de 133 pb del gen de la beta actina usando un conjunto de iniciadores específicos para ADN modificado, los cuales amplifican independientemente del estado de metilación de la muestra.

PCR específica para metilación (MSP)

Para evaluar el estado de la metilación del gen *CDH1*, se analizaron cinco islas CpG de la región

promotora en las posiciones 913, 852, 846, 838 y 836. Esta región específica se amplificó dos veces mediante PCR convencional usando iniciadores específicos para las islas CpG metiladas y las no metiladas, según descripción previa (18).

Las secuencias de los iniciadores se presentan en el cuadro 3. La PCR se hizo en un volumen total de 20 µl que contenían 100 ng de ADN convertido con bisulfito, 0,5 µM de cada iniciador, 0,2 mM de la mezcla de los dNTP (GE, Fairfield, CT, USA), 2 mM de cloruro de magnesio y 1 U de *Taq* polimerasa Platinum en solución tampón 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Como control positivo de la amplificación del estado metilado y del no metilado, se hizo una reacción usando el estuche Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para cada conjunto de iniciadores, en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 57 °C y 53 °C (metilado y no metilado, respectivamente) durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos, finalizando con 72 °C durante 10 minutos.

Análisis de la disociación de alta resolución sensible a la metilación

La disociación de alta resolución sensible a la metilación (*Methylation-Sensitive High Resolution Melting*, MS-HRM) se hizo para semicuantificar el grado de metilación del promotor del *CDH1*. Se diseñaron iniciadores específicos para la región promotora del *CDH1*, usando el programa Methyl Primer Express™ (Applied Biosystems, Carlsbad,

CA, USA), cuyas secuencias se presentan en el cuadro 3. La disociación se hizo en un volumen final de 20 μ l, usando la mezcla MeltDoctor™ HRM Master Mix 1X (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 0,5 μ M de cada iniciador y 80 ng de ADN convertido con bisulfito en las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y uno de un minuto a 60 °C. Por último, el análisis de disociación de alta resolución se hizo a partir de 60 °C durante un minuto, con aumento progresivo de temperatura de 0,3 % cada 15 segundos hasta alcanzar los 95 °C. Se utilizaron diluciones del estuche Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para elaborar las curvas de los patrones de metilación a 100, 10, 5, 2, 1 y 0 %.

Todos los experimentos se hicieron en el equipo Applied Biosystems Step One plus Real-Time PCR System. Con la comparación de las curvas de los patrones de metilación mediante el programa HRM™ v3.0.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), se determinó el porcentaje de metilación de las regiones promotoras del gen *CDH1* en el grupo de estudio.

Extracción de ARN

En cada muestra de sangre se separaron las células mononucleares (*Peripheral Blood Mono nuclear Cell*, PBMC) con el medio Histopaque 1077 (St. Louis, MO, USA). El ARN total se extrajo usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las muestras de ARN se cuantificaron en el equipo NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA). Las razones 260 a 230 y 260 a 280 sirvieron para determinar la pureza, y la integridad de las moléculas se evaluó con la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) del estuche RNA 6000 Nano Kit en un bioanalizador 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN fue convertido en ADN complementario usando ADNasa I y transcriptasa inversa (SuperSript III Transcriptase Reverse, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La expresión génica se evaluó cuantitativamente usando la mezcla Taqman Universal PCR Master Mix y las sondas Taqman prediseñadas del *CDH1* (Hs00254446_m1), y del *GAPDH* (Hs02758991_g1) usado como gen constitutivo, (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), según el protocolo del proveedor.

Todos los experimentos se hicieron en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System y se analizaron con el programa DataAssist v3.01™. El nivel de expresión de la transcripción (*Fold change*, FC) se calculó con la ecuación $FC=2^{-\Delta C_t}$ según recomendación de Schmittgen, *et al.* (19), comparando el grupo de casos con el de control. Cada experimento se hizo por triplicado con cada muestra.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa estadístico SPSS®, versión 22 para Windows (Chicago, IL, USA). Las pruebas t de Student y U de Mann-Whitney se usaron para comparar los datos de expresión génica entre los grupos. La regresión logística incondicional se usó para calcular la razón de probabilidades (*odds ratio*, OR), con un intervalo de confianza de 95 % (IC_{95%}), de la relación de los genotipos con el cáncer de mama.

Para evaluar la relación de los genotipos y los perfiles de metilación con las características histopatológicas, se hicieron la prueba de ji al cuadrado y la exacta de Fisher, en tanto que, con el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Kruskal-Wallis, se hizo el análisis multivariado. Los valores de probabilidad (p) menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Para el análisis de los resultados de expresión génica, el valor de p se ajustó mediante el método de Benjamini-Hochberg para establecer la tasa de falsos descubiertos.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos de este estudio fueron aprobados por el *Comité Nacional de Ética em Pesquisa*, bajo el número de aprobación CAAE: 01779812.9.0000.5440, y por el Comité de Ética en Investigación del Hospital das Clínicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo. El consentimiento informado fue firmado por todos los participantes en el estudio.

Resultados

Asociación del polimorfismo rs5030625 y el riesgo de cáncer de mama

La variante rs5030625 del gen *CDH1* se analizó en 102 pacientes con cáncer de mama y en 102 mujeres sanas que hacían parte del grupo de control. Las frecuencias genotípicas se calcularon y se comprobó si se mantenía el equilibrio de Hardy-Weimberg ($p>0,05$), con lo cual se evidenció la falta

de estratificación poblacional. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los genotipos G/G, G/GA y GA/GA entre el grupo de pacientes y el grupo de control ($\chi^2=0,329$; $gl=2$; $p=0,848$). El análisis de asociación hecho mediante regresión logística incondicional para evaluar el posible efecto de la variante en el riesgo de desarrollar cáncer de mama, indicó que no hubo asociación significativa entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de la enfermedad. En cuanto a las otras variables y factores de riesgo analizados en este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas entre el grupo de casos y el de control.

Estado de la metilación de las islas CpG en las regiones promotoras del CDH1 y el desarrollo del cáncer de mama

El estado de la metilación de las islas CpG de la región promotora del gen *CDH1* se evaluó mediante PCR específica para metilación (*Methylation-Specific PCR*, MSP) y MS-HRM. Los resultados obtenidos evidenciaron la existencia de perfiles de metilación aberrantes en el promotor del *CDH1*. Según el análisis por MSP del grupo de casos, en 59 (57,8 %) pacientes se encontró el promotor metilado. Debe resaltarse que no se observó metilación del promotor en los individuos del grupo de control. Después del análisis mediante MSP, las muestras se sometieron a MS-HRM para semicuantificar su nivel de metilación, y se comprobó de nuevo que en el grupo de control no hubo metilación (0 %) en la región promotora del *CDH1*. Con respecto al grupo de casos, el análisis de MS-HRM mostró niveles de metilación inferiores al 1 % en los individuos que habían presentado el promotor metilado en la MSP.

En cuanto a los otros factores de riesgo considerados en el estudio, como la edad de la menarquia, la edad de la menopausia, la edad y el número de gestaciones, el uso de anticonceptivos y el tratamiento de reemplazo hormonal, no hubo asociación de ninguno de ellos con el perfil aberrante de metilación ($p>0,05$).

Con respecto a las características clínico-patológicas del tumor, el estado de metilación del promotor del *CDH1* presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad en el momento del diagnóstico ($\chi^2=12,57$; $gl=1$; $p<0,001$). Se encontraron resultados similares en relación con el tipo histológico, el tamaño del tumor y la presencia de metástasis ($\chi^2=14,185$; $gl=1$; $p<0,001$; $\chi^2=13,123$;

$gl=1$; $p<0,001$, y $\chi^2=7,954$; $gl=1$; $p=0,005$, respectivamente). En el cuadro 4 se resumen los resultados obtenidos y su distribución según las características clínico-patológicas del tumor. Cabe resaltar la tendencia del estado de la metilación con respecto a la progresión del cáncer. El porcentaje de pacientes que no presentaban metilación del promotor del *CDH1* fue mayor en aquellos individuos con etapas más avanzadas de la enfermedad (tumor de mayor tamaño y grado, y metástasis).

Los resultados del estado de la metilación se analizaron en relación con la variante rs5030625 y no se encontraron diferencias en la distribución de los genotipos en cuanto al estado de la metilación del promotor del *CDH1* ($\chi^2=0,930$; $gl=2$; $p=0,628$). De igual manera, se encontró metilación

Cuadro 4. Estado de metilación de las regiones promotoras del gen *CDH1* en el grupo de estudio

	U (%)	M (%)	p
Todos			
Control	102 (100)	0 (0,0)	<0,001
PCM	43 (42,16)	59 (57,84)	
≤60 años			
Control	38 (48,7)	37 (47,4)	0,002
BC	11 (23,4)	36 (76,6)	
>60 años			
Control	6 (25,0)	18 (75,0)	0,007
BC	32 (58,2)	23 (41,8)	
Tipo histológico			
CDI	26 (32,5)	54 (67,5)	<0,001
Otros	17 (77,3)	5 (22,7)	
Grado del tumor			
I+II	27 (37,0)	46 (63,0)	0,093
III+IV	16 (55,2)	13 (44,8)	
Tamaño del tumoral			
T1	10 (22,2)	35 (77,8)	<0,001
T2+T3	33 (57,9)	24 (42,1)	
Estado de ganglios linfáticos			
Positivo	22 (38,6)	35 (61,4)	0,412
Negativo	21 (46,7)	24 (53,3)	
Metástasis			
Positivo	34 (37,4)	57 (62,6)	0,005
Negativo	9 (81,8)	2 (18,2)	
Estado del receptor hormonal			
RE+	40 (44,4)	50 (55,6)	0,728
RE-	3 (33,3)	6 (66,7)	
RP+	39 (46,4)	45 (53,6)	0,155
RP-	4 (26,7)	11 (73,3)	
HER-	29 (42,0)	40 (58,0)	0,926
HER+	9 (40,9)	13 (59,1)	

PCM: pacientes con cáncer de mama; U: promotor no metilado; M: promotor metilado; CDI: carcinoma ductal invasivo; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; +: positivo; -: negativo
El valor de $p<0,05$ se consideró significativo y se destaca en negrilla.

del promotor en 42 de las 71 (59,2 %) pacientes homocigotas para el alelo silvestre, en 14 de las 27 (51,9 %) pacientes heterocigotas y en dos de las cuatro (50 %) pacientes homocigotas para la variante.

Perfil de expresión génica del *CDH1* y su relación con el riesgo de cáncer de mama

La expresión génica del *CDH1* se evaluó en todos los individuos que participaron en el estudio. Los resultados evidenciaron que en el grupo de pacientes con cáncer de mama había una leve disminución de la expresión génica del *CDH1*, en comparación con el grupo de control; sin embargo, esta no fue estadísticamente significativa ($\log_2 \text{fold change} = -0,168 \pm 0,13$; $p=0,506$). En cuanto a las características histopatológicas del tumor, la presencia de metástasis distales se correlacionó con alteraciones en la expresión génica del *CDH1* (figura 1). Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa en las pacientes que presentaban metástasis distales, en comparación con aquellas que no la presentaban ($p=0,002$). Otras características tumorales y el estado de los receptores hormonales de estrógeno, de progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermal Growth Factor Receptor*, HER2), no mostraron influencias significativas en la distribución de los resultados.

Con respecto a la variante rs5030625, los análisis no mostraron asociación entre los genotipos y los cambios en la expresión génica del *CDH1*, ni en el grupo de casos ni en el de control. Por último, los análisis del estado de la metilación del promotor del *CDH1* revelaron una disminución significativa en la expresión génica del *CDH1* en cuanto al estado de la metilación del promotor ($p=0,004$), como se muestra en la figura 2.

Discusión

La cadherina E tiene un papel importante en la regulación de las concentraciones citoplasmáticas de la beta catenina. En este estudio se analizó la variante rs5030625 localizada en la región promotora del gen *CDH1*. Este polimorfismo es una inserción del nucleótido adenina (A) en la posición 347 de la secuencia promotora. Los SNP en la región promotora pueden modular la eficiencia de la transcripción del gen y su función; Shin, *et al.*, en líneas celulares específicas, demostraron que el polimorfismo rs5030625 presenta un efecto significativo en la actividad en la transcripción, ya

que en la proximidad del promotor se encuentran dos cajas E, una caja CAAT y una caja rica en G-C con sitio de unión en el factor de transcripción SP1, el cual interactúa con varios elementos reguladores que controlan la expresión específica del epitelio del *CDH1* (20).

Hasta donde se pudo constatar, esta es la primera vez que la variante rs5030625 se estudia en población brasilera. Estos resultados no mostraron asociación significativa entre la presencia del polimorfismo y el riesgo de desarrollar cáncer de mama; tampoco se encontró asociación con los cambios en el nivel de expresión de la transcripción del gen. Tipirisetti, *et al.*, evaluaron este mismo polimorfismo en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en población de la India y no encontraron asociación

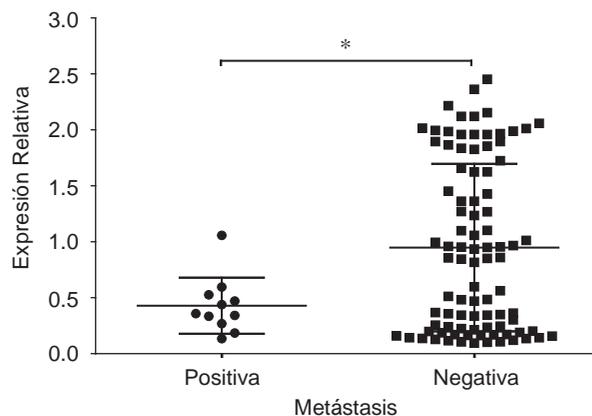


Figura 1. Nivel de expresión en la transcripción relativa del gen *CDH1* en el grupo de pacientes con cáncer de mama estratificadas según la presencia de metástasis

*Diferencias estadísticamente significativas: $p<0,05$

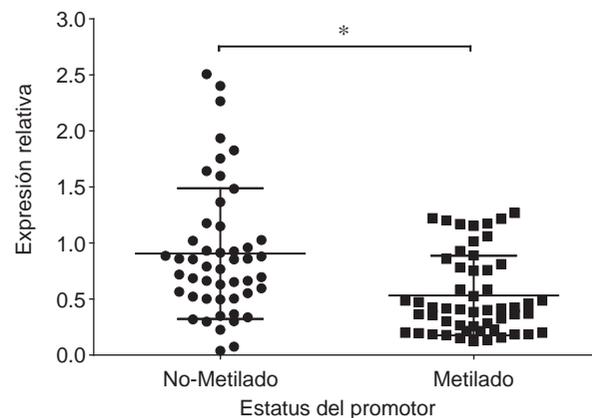


Figura 2. Nivel de expresión en la transcripción relativa del gen *CDH1* en relación con el estado de metilación del promotor

*Diferencias estadísticamente significativas: $p<0,05$

de esta variante con el riesgo de desarrollar cáncer de mama, lo cual coincide con los resultados de este estudio (10). En algunos estudios se ha analizado la relación de otro polimorfismo en esta región del *CDH1*, la variante -160A, con el riesgo de desarrollar cáncer de mama y no se ha encontrado asociación (21,22), mientras que en algunos otros estudios, se encontró un aumento significativo del riesgo de desarrollar este cáncer (10,23). Los resultados concernientes al efecto de las variables en la región promotora del *CDH1* y su asociación con el cáncer de mama no fueron suficientemente claros, por lo que es necesario determinar el efecto real de estas mutaciones en el funcionamiento de la proteína. Contrario a lo observado en este estudio, en varias investigaciones se ha asociado el polimorfismo rs5030625 con la endometriosis (24,25) y el cáncer colorrectal en población china (2), con una mayor agresividad del adenocarcinoma esofágico en población holandesa (26) y, del cáncer gástrico familiar, en Corea del Sur (20,27), resultados que indican la importancia de estudiar estos polimorfismos en diferentes poblaciones, pues la variabilidad genética puede influir en su efecto en la propensión individual a desarrollar cáncer.

El gen *CDH1* frecuentemente se encuentra en estado de metilación en el tejido tumoral en el cáncer de la mama, mas no en el tejido mamario normal (13). Los resultados que se presentan revelaron un estado aberrante de metilación en el promotor del gen *CDH1*, y en el análisis mediante MS-HRM se determinó un porcentaje de metilación bajo (inferior a 1 %), pero diferente en casos y controles, lo cual evidenció que los niveles de metilación de los promotores específicos en las PBMC de mujeres con cáncer de mama eran moderadamente mayores que los de las mujeres sanas, y que podrían servir de base para el desarrollo de marcadores específicos de diagnóstico de esta enfermedad. En este mismo sentido, Sebova, *et al.*, encontraron el promotor del *CDH1* en estado de metilación en la sangre periférica de 20 de 92 pacientes con cáncer de mama.

Al igual que en este estudio, el promotor metilado del *CDH1* no se encontró en el grupo de control, y no se asoció con ninguna característica histopatológica del tumor (28). Contrario a lo aquí reportado, en los estudios de Sturgeon, *et al.*, y de Zmetakova, *et al.*, no se asoció la metilación del promotor del *CDH1* con el cáncer de mama (29,30). En cuanto a las características histopatológicas del tumor, se observó una asociación entre el estado de la metilación del promotor y los estados

iniciales del tumor, caracterizados por ausencia de metástasis y un menor tamaño del tumor, lo cual evidenciaría la necesidad de la célula maligna de inactivar la cadherina E en las primeras fases del proceso de carcinogénesis. El gen *CDH1* es un importante supresor tumoral asociado previamente con muchos tipos de cáncer. En el caso del cáncer de mama, los resultados que se presentan ofrecen evidencia adicional de que en el proceso de carcinogénesis ocurren epimutaciones en genes claves del control celular, como el *CDH1*, que pueden alterar la expresión en la transcripción de sus productos génicos y estimular la transformación y aparición del fenotipo maligno.

Existen varios estudios que señalan el posible papel de la metilación constitutiva en el ADN extraído de sangre periférica como factor de predisposición al cáncer (31-33). Wong, *et al.*, encontraron que la metilación del promotor del gen *BRCA1* en sangre periférica era más frecuente en pacientes que habían desarrollado el cáncer de mama precozmente y, también, correlacionaron estos resultados con altos niveles de metilación del *BRCA1* en muestras de biopsia de tumores (32).

En la presente investigación, los resultados evidenciaron un perfil diferencial de metilación del *CDH1* en los grupos de estudio y se pudieron separar con mucha especificidad los casos de los controles; los datos sugieren la existencia de diferencias reales, aunque pequeñas, por lo cual se precisa prestar mucha atención y validarlos para evitar posibles falsos positivos. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que la metilación en sangre puede reflejar una predisposición al cáncer. Sin embargo, dichos cambios fueron relativamente pequeños y, además, se registró una gran superposición entre casos y controles, por lo cual la potencial utilidad de los perfiles de metilación del ADN en sangre periférica para la detección o como marcador de diagnóstico para cáncer puede ser limitada.

La expresión en la transcripción del *CDH1* mostró una disminución no significativa en los pacientes con cáncer de mama. En este mismo sentido, en muchos estudios se ha encontrado una disminución significativa de la expresión génica del *CDH1* en este tipo de cáncer, independientemente del tipo histológico o molecular, lo cual sugiere la importancia de este gen en la progresión del cáncer de mama (11,12). Con relación a las características histopatológicas del tumor, se encontró una disminución de la expresión en la transcripción

del *CDH1* en presencia de metástasis. En este estudio, se registró una clara disminución de los niveles de expresión en la transcripción del *CDH1* en las pacientes con cáncer metastásico, lo cual concuerda con lo encontrado en estudios anteriores, e indica la importancia de la cadherina E en la adhesión celular y en el mantenimiento normal del epitelio que relacionan estrechamente esta molécula con el proceso de metástasis. Asimismo, los altos niveles de expresión del *CDH1* se relacionaron con tumores en las etapas iniciales que mantenían su adherencia celular y tenían bajo poder metastásico, mientras que una menor expresión se relacionó con mayores grados del tumor, con la pérdida de la adhesión celular y con un acentuado comportamiento invasivo (2,11,34). Los niveles de expresión en la transcripción del *CDH1* no se relacionaron con el estado de la metilación del promotor, posiblemente debido a que otros mecanismos, como las mutaciones génicas, la pérdida de heterocigosidad, los cambios en la estructura de la cromatina y las alteraciones específicas de la transcripción, regulan la expresión del *CDH1* (11).

Puede concluirse que la cadherina E juega un papel muy importante en el proceso de carcinogénesis, especialmente relevante en la metástasis tumoral. El polimorfismo rs5030625 en la región promotora del *CDH1* no mostró asociación con el desarrollo del cáncer de mama; sin embargo, los cambios en los perfiles de metilación y de expresión en la transcripción de este gen se relacionaron claramente con características histopatológicas del tumor, como la presencia de metástasis, y podrían servir de base para el desarrollo de marcadores específicos de diagnóstico de esta enfermedad. Los resultados que aquí se presentan evidencian el papel relevante de la cadherina-E en el desarrollo y la progresión del cáncer de mama.

Agradecimientos

Los autores agradecen sinceramente la cooperación de todos los voluntarios que participaron en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ninguna relación de carácter financiero con ninguna organización o entidad que pudiera dar lugar a un conflicto de intereses respecto a este artículo.

Financiación

Esta investigación fue financiada en parte por la Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de

São Paulo – FAPESP (Proceso no. 2013/00824), la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES y el Programa de Estudante Convênio – Pós-Graduação – PEC-PG (Proceso no. 5516-11-0).

Referencias

1. **Takeichi M.** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991;251:1451-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2006419>
2. **Zou XP, Dai WJ, Cao J.** CDH1 promoter polymorphism (-347G-->GA) is a possible prognostic factor in sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15:5340-5. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.15.5340>
3. **van Roy F, Berx G.** The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65:3756-88. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>
4. **Aristizábal-Pachón AF.** Complexo de Degradação de b-Catenina e o Câncer de mama. Saarbrücken: Novas Edições Acadêmicas; 2015. p. 25-9.
5. **Rimm DL, Morrow JS.** Molecular cloning of human E-cadherin suggests a novel subdivision of the cadherin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200:1754-61. [http://dx.doi.org/S0006-291X\(84\)71656-1](http://dx.doi.org/S0006-291X(84)71656-1)
6. **Gumbiner BM, McCrean PD.** Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:155-8.
7. **Cavallaro U, Christofori G.** Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:118-32. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1276>
8. **Chien MH, Chou LSS, Chung TT, Lin CH, Chou MY, Weng MS, et al.** Effects of E-cadherin (CDH1) gene promoter polymorphisms on the risk and clinicopathologic development of oral cancer. *Head Neck*. 2012;34:405-11. <http://dx.doi.org/10.1002/hed.21746>
9. **Handschuh G, Candidus S, Lubber B, Reich U, Schott C, Oswald S, et al.** Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene*. 1999;18:4301-12. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202790>
10. **Tipiriseti NR, Govatati S, Govatati S, Kandukuri LR, Cingeetham A, Singh L, et al.** Association of E-cadherin single-nucleotide polymorphisms with the increased risk of breast cancer: A study in South Indian women. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2013;17:494-500. <http://dx.doi.org/10.1089/gtmb.2012.0485>
11. **Asiaf A, Ahmad ST, Aziz SA, Malik AA, Rasool Z, Masood A, et al.** Loss of expression and aberrant methylation of the CDH1 (E-cadherin) gene in breast cancer patients from Kashmir. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:6397-403.
12. **Tudoran O, Virtic O, Balacescu L, Pop L, Dragla F, Eniu A, et al.** Differential peripheral blood gene expression profile based on HER2 expression on primary tumors of breast cancer patients. *PLoS One*. 2014;9:e102764. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0102764>
13. **Campan M, Weisenberger DJ, Laird PW.** DNA methylation profiles of female steroid hormone-driven human malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;310:141-78.

14. **Aristizábal-Pachón AF, Carvalho TI, Carrara HH, Andrade J, Takahashi CS.** AXIN2 polymorphisms, the beta-catenin destruction complex expression profile and breast cancer susceptibility. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:7277-84. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.16.7277>
15. **Aristizábal-Pachón AF, de Carvalho TI, Carrara HH, de Andrade JM, Takahashi CS.** Detection of human mammaglobin A mRNA in peripheral blood of breast cancer patients before treatment and association with metastasis. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2015;27:217-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnci.2015.09.003>
16. **Brito C, Portela MC, Vasconcellos MT.** Survival of breast cancer women in the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2009;43:481-9. <http://dx.doi.org/S0034-89102009000300012>
17. **Instituto Nacional de Câncer.** Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. Fecha de consulta: 1 de mayo de 2015. Disponible en: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenha-estimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf
18. **Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Okubo M, Yamashita H, Yoshioka D, et al.** Association between polymorphisms in the XRCC1 and GST genes, and CpG island methylation status in colonic mucosa in ulcerative colitis. *Virchows Arch.* 2011;458:205-11. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-010-1038-x>
19. **Schmittgen TD, Livak KJ.** Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3:1101-8.
20. **Shin Y, Kim IJ, Kang HC, Park JH, Park HR, Park HW, et al.** The E-cadherin -347G-->GA promoter polymorphism and its effect on transcriptional regulation. *Carcinogenesis.* 2004;25:895-9. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgh073>
21. **Beeghly-Fadiel A, Lu W, Gao YT, Long J, Deming SL, Cai Q, et al.** E-cadherin polymorphisms and breast cancer susceptibility: A report from the Shanghai Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;121:445-52. <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-009-0579-7>
22. **Lei H, Sjoberg-Margolin S, Salahshor S, Werelius B, Jandakova E, Hemminki K, et al.** CDH1 mutations are present in both ductal and lobular breast cancer, but promoter allelic variants show no detectable breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2002;98:199-204. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.10176>
23. **Yu JC, Hsu HM, Chen ST, Hsu GC, Huang CS, Hou MF, et al.** Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the genes involved in the estrogen-receptor-signaling pathway: A multigenic study on cancer susceptibility. *J Biomed Sci.* 2006;13:419-32. <http://dx.doi.org/10.1007/s11373-006-9069-7>
24. **Shan K, Xiao-Wei M, Na W, Xiu-Feng Z, Deng-Gui W, Wei G, et al.** Association of three single nucleotide polymorphisms of the E-cadherin gene with endometriosis in a Chinese population. *Reproduction.* 2007;134:373-8. <http://dx.doi.org/134/2/373>
25. **Tempfer CB, Simoni M, Destenaves B, Fauser BC.** Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part II--endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2009;15:97-118. <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmn040>
26. **Boonstra JJ, Marion R, Tilanus HW, Dinjens WN.** Functional polymorphisms associated with disease-free survival in resected carcinoma of the esophagus. *J Gastrointest Surg.* 2010;15:48-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s11605-010-1358-9>
27. **Yamada H, Shinmura K, Goto M, Iwaizumi M, Konno H, Kataoka H, et al.** Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients. *Mol Cancer.* 2009;8:63. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-8-63>
28. **Sebova K, Zmetakova I, Bella V, Kajo K, Stankovicova I, Kajabova V, et al.** RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer. *Cancer Biomark.* 2011;10:13-26. <http://dx.doi.org/10.3233/CBM-2012-0230>
29. **Sturgeon SR, Balasubramanian R, Schairer C, Muss HB, Ziegler RG, Arcaro KF.** Detection of promoter methylation of tumor suppressor genes in serum DNA of breast cancer cases and benign breast disease controls. *Epigenetics.* 2012;7:1258-67. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.22220>
30. **Zmetakova I, Danihel L, Smolkova B, Mego M, Kajabova V, Krivulcik T, et al.** Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma.* 2013;60:635-46. http://dx.doi.org/10.4149/Neo_2013_082
31. **Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, Karagas MR, Houseman EA, Kelsey KT.** DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29:1133-9. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2010.31.3577>
32. **Wong EM, Southey MC, Fox SB, Brown MA, Dowty JG, Jenkins MA, et al.** Constitutional methylation of the BRCA1 promoter is specifically associated with BRCA1 mutation-associated pathology in early-onset breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4:23-33. <http://dx.doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0212>
33. **Brennan K, García-Closas M, Orr N, Fletcher O, Jones M, Ashworth A, et al.** Intragenic ATM methylation in peripheral blood DNA as a biomarker of breast cancer risk. *Cancer Res.* 2012;72:2304-13. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3157>
34. **Yuan YL, Wang YM, Liu H, Qin GF, Tang AG, Duan Y.** Aberrant expression of E-cadherin in lung tissues of patients with probable lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:5149-53.