

# Biomarcadores epigenéticos: hacia su implantación en la rutina clínica

José Luis García-Giménez<sup>1,2,3,4,5\*</sup>, Gisselle Pérez-Machado<sup>4,5</sup>, Jesús Beltrán-García<sup>2,3,4</sup>, Eva García-López<sup>4,5</sup>, Ester Berenguer-Pascual<sup>3,5</sup>, Carlos Romá-Mateo<sup>2,3,4</sup>, Federico Pallardó<sup>1,2,3</sup> Salvador Mena-Mollá<sup>3,5\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Instituto de Salud Carlos III. Valencia, España

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA. Valencia, España

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología. Universitat de València. València, España

<sup>4</sup> Plataforma de investigación en epigenética (CIBERER/UV/INCLIVA). Valencia, España

<sup>5</sup> EpiDisease S.L. Spin-Off de CIBERER (ISCIII). Valencia, España

Autores de correspondencia: José Luis García-Giménez (j.luis.garcia@uv.es) y Salvador Mena-Mollá (salvador.mena@uv.es)

## RESUMEN

La práctica clínica requiere de nuevas técnicas que permitan la identificación de los individuos en riesgo de desarrollar una enfermedad mediante su detección eficaz y precoz, pero la clínica también necesita de herramientas que permitan predecir la evolución de la patología a lo largo del tiempo, así como su respuesta frente a un tratamiento. En la actualidad, los principales indicadores clínicos se basan en técnicas de imagen y ciertos biomarcadores que presentan limitaciones y que, en algunos casos, los biomarcadores epigenéticos han demostrado superar.

La comprensión de los mecanismos epigenéticos (metilación del ADN, modulación de las modificaciones postraduccionales de las histonas, y los ARN no codificantes) ha permitido que en las últimas décadas aparezcan multitud de nuevos candidatos para su uso como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de las enfermedades. Por eso, en esta revisión describimos los fundamentos de algunos biomarcadores epigenéticos y algunas técnicas y tecnologías que se están utilizando para su detección.

En un futuro cercano, este tipo de tecnologías se incorporarán a los laboratorios clínicos y, por lo tanto, el uso de estos biomarcadores se implementará en la rutina de diagnóstico clínico, contribuyendo así a la aplicación real de la teragnosis y mejorando la medicina de precisión.

Palabras clave: Biomarcadores epigenéticos, metilación del ADN, histonas, modificaciones postraduccionales en histonas, micro-ARNs, diagnóstico *in vitro* (IVD).

## INTRODUCCIÓN

Los avances en genómica y epigenómica están permitiendo la generación de nuevos test para el diagnóstico temprano, el pronóstico y la monitorización del efecto y la idoneidad de las terapias. En particular la epigenética está revolucionando la biomedicina y el diagnóstico clínico contribuyendo enormemente al desarrollo de la medicina de precisión al aportar biomarcadores con nuevas características de especial relevancia para el manejo clínico de las enfermedades.

A lo largo de este artículo manejaremos el concepto de biomarcador epigenético definido como cualquier marca epigenética o alteración de mecanismo epigenético que es estable y reproducible durante la toma

y el procesamiento de la muestra biológica, ya sea fluido biológico o preparaciones de tejido fresco, congelado o fijado como muestras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE, *formalin-fixed, paraffin-embedded*) y que idealmente debería cumplir alguno de los siguientes requisitos: (i) define una enfermedad (diagnóstico), (ii) incluso antes de la aparición de los primeros síntomas (diagnóstico precoz); (iii) revela información sobre la historia natural de una enfermedad; (iv) predice la progresión y el desenlace de una enfermedad (pronóstico); (v) responde a la terapia (predictivo); (vi) permite el seguimiento de las respuestas a la terapia (monitorización de terapias), y (vii) permite el establecimiento de una terapia dirigida adecuada en función del diagnóstico (teragnosis) (García-Giménez, 2016a; Garcia-

Gimenez, 2017). Las modificaciones epigenéticas a lo largo del genoma representan un sistema perfectamente orquestado que modula la organización de la cromatina y en último término la transcripción óptima del genoma en el tipo celular y el momento adecuado. En este sentido, la identificación de cambios aberrantes en las modificaciones o mecanismos epigenéticos se ha asociado a distintas enfermedades humanas (Toraño, 2012) y en consecuencia estas alteraciones epigenéticas proveen nuevos biomarcadores que pueden ayudar en la toma de decisiones clínicas (Hu, 2009; Balgkouranidou, 2016; Gao, 2016; Vrtačnik, 2014; Markopoulou, 2012; Heichman and Warren, 2012).

Existen varias ventajas de los biomarcadores epigenéticos en relación a otros biomarcadores. Aportan información relevante sobre la función adecuada de un gen en un tipo celular – por ejemplo sobre el estado de metilación, o la heterocromatinización de un promotor o una región reguladora – pero además pueden incorporar información sobre cómo el entorno, el estilo de vida y la alimentación de un individuo afectan, en último término, a la expresión de un gen o conjunto de genes que alteran rutas moleculares esenciales para la homeostasis celular (Relton, 2015; Andersen, 2015). Es por ello que los biomarcadores epigenéticos pueden considerarse bioarchivos que incluso pueden almacenar la información de la historia natural de una enfermedad. Otra ventaja es que por la propia naturaleza de algunos biomarcadores epigenéticos (como los microARN y algunas modificaciones postraduccionales de las histonas, PTM por sus siglas en inglés) son muy estables en fluidos como plasma, suero, orina, saliva, semen, secreciones vaginales, etc. o incluso en gota de sangre seca (Guthrie Cards) (Glinge, 2017; Park, 2009; Zubakov, 2010), pero también en preparaciones de tejidos, como por ejemplo en cultivos celulares, tejido fresco, congelado, y fijado (Patnaik, 2010; Peiró-Chova, 2013). En efecto, ya en uno de nuestros estudios demostramos que los microARN son extremadamente estables en muestras descongeladas y en tejidos parafinados (Patnaik, 2010; Peiró-Chova, 2013). En relación a la relativa estabilidad de algunas PTMs en las histonas, ello no supone una dificultad importante a

la hora de su análisis, siempre que se tomen ciertas precauciones en los protocolos de extracción; por ejemplo, ciertas modificaciones específicas como la fosforilación requieren tener en cuenta ciertas precauciones metodológicas particulares en los protocolos de extracción, como añadir inhibidores de fosfatasas.

En otros trabajos también se ha demostrado que la determinación de la metilación del ADN en un panel de 22 genes estudiados no se veía alterada entre muestras de plasma EDTA conservadas a 4 °C, -20 °C y -80 °C (Bulla, 2016). Por otro lado, Joo y cols., demostraron que en muestras de sangre seca (*Guthrie Cards*) era posible analizar la metilación del genoma mediante el ensayo *Infinum Human Methylation 450 Beadchip* (Joo, 2013).

Tras destacar la estabilidad de los biomarcadores epigenéticos y su presencia en distintos tipos de muestra, para su implantación a la clínica es necesario discutir sobre los métodos y procedimientos de detección y análisis. Podría pensarse que estos nuevos biomarcadores epigenéticos son fácilmente adaptables a las herramientas y los procedimientos rutinarios de un laboratorio clínico (Collinson, 2015). No obstante, existen ciertas limitaciones en relación a su implementación en un laboratorio clínico. Por mencionar algunos aspectos: en algunos casos los biomarcadores candidatos requieren de un procesamiento previo de la muestra antes de su análisis (por ejemplo, el tratamiento con bisulfito para el análisis de la metilación del ADN, o el aislamiento y separación de exosomas para el análisis de microARN circulantes). En algunos casos, se requiere adaptar tecnologías rutinarias a la medida de los nuevos biomarcadores, pero en otros casos se requiere adoptar tecnologías de alto rendimiento, como la secuenciación masiva (NGS), a ensayos que sean realmente asequibles, no solo en cuanto a su precio sino también al tiempo necesario para el análisis de los resultados. En relación a estos dos últimos puntos, las compañías de diagnóstico *in vitro* (IVD) están trabajando en el desarrollo de kits sencillos de manejar, que permitan tanto el procesamiento de la muestra como la purificación y la detección del biomarcador epigené-

tico de interés para así acelerar el proceso de adopción de estas tecnologías por parte de los laboratorios clínicos.

## MEJORAS EN LOS PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE LOS BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS

La biopsia líquida consiste en una nueva estrategia para identificar, de forma no invasiva y relativamente fácil, algunos componentes de la sangre y otros fluidos biológicos que pueden servir como biomarcadores de diagnóstico, como son las células tumorales circulantes (CTC), el ADN libre circulante (*cell free DNA*, cfDNA) y los exosomas (micro-vesículas que pueden transportar microARN, ARN no codificantes largos y ADN de doble cadena circulante). El análisis a partir de muestras de sangre periférica está tomando una gran relevancia para el diagnóstico dada la poca invasividad y facilidad de extracción que supone (Yap, 2014; Mabert, 2014; Kosaka, 2010a; Thakur, 2014). Además, también es posible aislar otro tipo de marcadores epigenéticos a partir de muestras de sangre como los microARN circulantes libres, histonas y nucleosomas.

### Metilación del ADN

La extracción de ADN es una técnica habitual para múltiples aplicaciones de biología molecular, por lo que hay disponibles varios kits comerciales. Existen diferentes métodos, por lo que para su elección en clínica hay que tener en cuenta diferentes factores, como: a) la calidad, la concentración y pureza del ADN obtenido que debe ser adecuada para su posterior uso; b) la automatización y la simplicidad; y c) el precio.

Los diferentes métodos de extracción se basan en: a) extracción orgánica en la que las proteínas son precipitadas con fenol y cloroformo, y el ADN es posteriormente purificado con etanol o isopropanol; b) adsorción específica a membrana o partículas de sílice; c) reconocimiento específico del ADN por anticuerpos de unión al ADN o grupos funcionales específico; d) interacción específica entre los fosfatos cargados negativamente del ADN y las moléculas de superficie con carga positiva en el sustrato.

En relación al cfDNA, su aislamiento y cuantificación representa un reto debido a su baja cantidad y su naturaleza. Su fragmentación representa un problema adicional para la determinación del patrón de metilación cuando se procesa la muestra para su tratamiento con bisulfito. Por lo tanto, la purificación y cuantificación del cfDNA es un primer paso crítico para la obtención de resultados reales y, por ello el desarrollo de métodos estandarizados, reproducibles y que incrementen la eficiencia de los protocolos actuales es de vital importancia para la aplicación de estos métodos en la clínica (Devonshire, 2014). Actualmente existen distintos kits para la purificación de los ácidos nucleicos circulantes, aunque la mayoría se han diseñado para su uso en investigación y no para diagnóstico clínico. Algunos kits se han usado también para los estudios de metilación en cfDNA, tanto en forma de arrays como en análisis de metiloma completo (Zhai, 2012; Legendre, 2015; Li, 2016), aunque en este último caso se requiere de pasos previos de purificación y tratamiento de la muestra. Por su parte, otros kits se han usado para preparar las librerías en los experimentos de secuenciación o para realizar experimentos de RT-qPCR [retrotranscripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (q)], llegando a obtenerse con alguno de ellos hasta 100 ng de cfDNA por mL de plasma, con un rendimiento suficiente de ADN en el rango de tamaños de 50-1000bp (Schmidt, 2005), que es adecuado para estudios de NGS.

Por el contrario, el ADN extraído de leucocitos de sangre periférica o sangre entera se puede obtener fácilmente y con mayor cantidad y calidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los patrones de metilación identificados en leucocitos no siempre son representativos del patrón de metilación de otros tejidos, así por ejemplo puede diferir de los patrones de metilación observado en distintos tipos tumorales (Choi, 2009; Shen, 2017) y otras enfermedades como Alzheimer (Ozaki, 2017). No obstante, hay algún ejemplo en el que sí son informativos a este respecto, como el reciente trabajo publicado por Crujeiras y cols., donde encuentran varios sitios CpG con un patrón de metilación similar tanto en el tejido adiposo como en los leucocitos, estando ambos asociados con la obesidad (Crujeiras, 2017).

## microARN circulantes

Los microARN pueden ser detectados en los fluidos biológicos, y dado que sus niveles aparecen alterados en situaciones patológicas, han generado un gran interés en los últimos años (García-Gimenez, 2015). Sin embargo, al igual que ocurre con el cfDNA la purificación de los microARN en fluidos biológicos suele ser poco eficiente (Kroh, 2010). Se pueden encontrar tanto como moléculas libres en la circulación, empaquetados en micropartículas (exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos) (Kosaka, 2010b; Valadi, 2007; Zernecke, 2009), asociados a complejos lipoproteicos (lipoproteínas de alta densidad, high-density lipoprotein, HDL) (Vickers, 2011), como unidos a proteínas que participan en el silenciamiento de ARN para evitar su propia degradación (Arroyo, 2011). Dependiendo del protocolo que se utilice es posible aislar microARN circulantes libres, aquellos unidos a proteínas, solamente los que se encuentran asociados a microvesículas o bien los microARN totales presentes en la muestra de sangre (Moret, 2013).

Otro punto relevante a tener en cuenta cuando analizamos microARN circulantes es el tiempo en el que la muestra es procesada y el tiempo que ha sido almacenado el suero o el plasma. De hecho, es muy recomendable procesar los tubos de sangre con EDTA durante las 6 primeras horas después de su extracción (Tsui, 2002), ya que las células sanguíneas, incluyendo los eritrocitos, pueden liberar este tipo de moléculas, alterando de este modo la firma de microARN que debería ser utilizada como biomarcador (Dutttagupta, 2011). No obstante, se han podido extraer microARN a partir de muestras de suero que han sido guardadas a  $-25^{\circ}\text{C}$  durante al menos 40 años (Rounge, 2015) e incluso a partir de muestras conservadas durante 2-4 años a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Grasedieck, 2012). Por otro lado, y al igual que en el caso del cfADN, no existen kits de purificación de microARN específicamente diseñados para diagnóstico clínico, aunque sí distintos kits comerciales que permiten la purificación de microARN con un rendimiento adecuado, incluso para la construcción de librerías para la realización de smallRNA-seq mediante técnicas de NGS (Seco-Cervera, 2017). El kit *PAXgene Blood RNA* (Qiagen) es uno de los pocos kits aptos para IVD,

cuando se utilizan los tubos PAXgene para ARN en sangre. El ARN tiene una buena calidad cuando la muestra de sangre se congela durante largos períodos de tiempo con este sistema (Debey-Pascher, 2011).

No obstante, las muestras utilizadas como fuente de microARN requieren pasar algunos controles de calidad para evitar la alta degradación del ARN o la contaminación por otros microARNs liberados por otras células o tejidos distintos de los requeridos para el diagnóstico. Por ejemplo, se sabe que la hemólisis es una fuente de variación significativa en los perfiles de microARN que puede afectar el perfil de biomarcadores propuestos. La hemólisis puede ocurrir en diferentes pasos del muestreo y procesamiento hasta que se eliminan el resto de los componentes de la sangre para separar el plasma o el suero. Es por ello que las muestras de suero / plasma deben analizarse previamente para detectar la hemólisis, bien por métodos espectrofotométricos (Kirschner, 2011), midiendo el ratio de hemólisis (Zanutto, 2014), el *H-score* (Appierto, 2014) o utilizando el método *Harboe*, que mide la concentración de hemoglobina (MacLellan, 2014), aunque el método más rápido para controlar la hemólisis es el primero. Además, un método alternativo para identificar supuestas muestras hemolisadas es usar microARNs que se sabe están enriquecidos en los eritrocitos, como miR-451, y aquellos que no están influenciados por hemólisis como miR-23a-3p (Blondal, 2013). Shah et al., compararon varios métodos para evaluar la hemólisis en muestras de plasma o suero para su posterior uso en el análisis de microARN, encontrando que la relación de miR-451a a miR-23a-3p propuesta por Blondal et al. (Blondal, 2013) resultó ser el método más sensible para detectar bajos niveles de hemólisis, y debería incluirse en el ensayo durante el análisis de microARNs como control de calidad (Shah, 2016).

## Histonas y nucleosomas

El uso de las histonas como biomarcadores de enfermedad reside principalmente en dos posibilidades: bien en el análisis de sus PTM y sus variaciones en el contexto de la enfermedad, o bien en el análisis de la mera presencia de histonas en localizaciones extra-

celulares, principalmente el torrente sanguíneo. En este último caso, el análisis de las PTMs es a su vez una valiosa herramienta para el diagnóstico y/o pronóstico de ciertas enfermedades, como ha sido discutido anteriormente por García-Giménez (García-Giménez, 2015) y Reddy (Reddy, 2017). La mayoría de kits y métodos de purificación de histonas son diseñados para células en cultivo, tejido, o sangre total y todos ellos requieren que pueda obtenerse una elevada densidad de células sea por homogeneización de tejidos o aislamiento de células sanguíneas. Sin embargo, la detección de histonas libres o circulantes, así como el análisis de PTMs en histonas en sangre, requiere exclusivamente del aislamiento de la fracción de plasma o suero. Escasean los métodos para purificar histonas a partir de fluidos biológicos, aunque se han utilizado algunas alternativas para concentrar esta fracción. Una de ellas es el uso de filtros de centrifuga *Amicon-Ultra-15 10k* para concentrar proteínas de bajo peso molecular, como las histonas, en muestras de orina (Bohmann, 2014). Más recientemente, Reddy et al., han desarrollado un método denominado *Dual Acid Extraction protocol* (DAE) para aumentar la eficiencia de la purificación en suero (Reddy, 2017). El método es, básicamente, el mismo que el descrito por Shechter et al. (Shechter, 2007), pero excluyendo el tampón de lisis hipotónico, que no se requiere para las muestras de suero.

## MEJORA DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS

La preparación de la muestra es uno de los pasos más críticos en la investigación epigenética y, por supuesto, se vuelve fundamental en el diagnóstico clínico. El aislamiento eficiente y de alta calidad de los ácidos nucleicos, la cromatina y las histonas para los posteriores análisis, asegurarán que se puedan obtener resultados de la más alta calidad a partir de muestras clínicas. Es por ello que los métodos de preparación de muestras para el análisis de biomarcadores epigenéticos y para su aplicación en diagnóstico clínico se están intentando mejorar continuamente.

## Metilación del ADN

La conversión del ADN con bisulfito es un paso necesario en algunos de los procedimientos utilizados para análisis de metilación. El tratamiento del ADN con bisulfito convierte los residuos de citosina en uracilo, sin afectar a las citosinas metiladas. Sin embargo, este procedimiento presenta algunas limitaciones. En primer lugar, la cantidad de ADN convertido con bisulfito obtenido de algunas muestras biológicas es a menudo demasiado pequeña para permitir posteriormente el análisis de la metilación. El ADN convertido con bisulfito puede experimentar una degradación significativa durante la conversión (Tanaka and Okamoto, 2007) y durante el almacenamiento, disminuyendo la sensibilidad de los ensayos de metilación del ADN y haciendo que este no sea adecuado para un análisis posterior, si no se usa inmediatamente después del tratamiento con bisulfito (Wojdacz and Dobrovic, 2007). Además, existe riesgo de conversión incompleta, que daría lugar a errores de análisis, debido a que la conversión tan sólo se produce sobre ADN monocatenario siendo necesario asegurar la desnaturalización completa del ADN (Li and Tollefsbol, 2011). Otro factor a tener en cuenta es que el tratamiento con bisulfito no puede discriminar entre 5-metilcitosina y 5-hidroximetilcitosina, otra modificación del ADN (Huang, 2010).

Afortunadamente, en los últimos años se han comercializado varios kits que permiten mejorar la calidad de la conversión y la estabilidad del ADN tras su procesamiento con bisulfito. Holmes et al. estudiaron el rendimiento de diferentes kits para la conversión con bisulfito del ADN, evaluando a su vez diferentes bioespecímenes como FFPE, aspirados, lavados bronquiales, efusiones, plasma, suero y orina (Holmes, 2014). De especial relevancia es el hecho que las muestras de ADN tratadas con bisulfito fueron estables durante al menos 4 semanas cuando se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  utilizando algunos de estos kits. Ese resultado está de acuerdo con los hallazgos previos de Dietrich et al., donde el ADN convertido con bisulfito fue estable más de 2 años a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Dietrich, 2013). Más recientemente, Jung et al., detallaron varios métodos y protocolos para la preparación de muestras biológicas y su pos-



Figura 1. Esquema general de las distintas técnicas utilizadas para analizar patrones de metilación. Las técnicas se dividen en dos grupos: las que se analizan con un tratamiento previo con bisulfito, y las que se realizan sin dicho tratamiento. MS-MLPA, Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification; MSP, Methylation-Specific PCR; MS-HRM, Methylation-Sensitive High Resolution Melting.

terior conversión de bisulfito para varios tipos de muestras biológicas utilizadas en un entorno clínico (Jung, 2017).

Los ensayos para el análisis de la metilación del ADN se han basado en el uso de enzimas de restricción o bien en el uso de técnicas que requieren del tratamiento con bisulfito (Figura 1). Este tipo de ensayos para el análisis de la metilación del ADN se han utilizado en la rutina de laboratorio clínico para el diagnóstico de algunos síndromes raros. Algunas de estas técnicas se basan en el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación. Sin embargo, uno de los principales problemas de dichas técnicas es que los fragmentos de restricción generados se analizan mediante métodos semicuantitativos, como el Southern-blot o PCR seguida de una electroforesis, y por lo tanto los resultados e interpretación van a depender de la inspección visual del gel, complicando la automatización. Esta desventaja ha propiciado el desarrollo de otras alternativas como los ensayos de amplificación de múltiples sondas dependientes de ligasa y específicas de metilación (MS-MLPA por sus siglas en inglés), las pruebas basadas en la conversión química de ADN usando tratamiento con bisulfito,

las reacciones basadas en qPCR, las pruebas que analizan el perfil de fusión de alta resolución sensible a la metilación (MS-HRM por sus siglas en inglés) y, finalmente, la pirosecuenciación. La MS-HRM y la pirosecuenciación son las técnicas que tienen un mejor rendimiento, reproducibilidad y sensibilidad (Quillien, 2012; Migheli, 2013) y por ello son las que más aceptación están teniendo en el entorno clínico. La descripción detallada de cada una de estas técnicas se presenta en el libro *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*, editado por José Luis García-Giménez (García-Giménez, 2016b) y también en el libro *Enfermedades de Impronta*. Guías de buena práctica clínica, editado por Guiomar Pérez y Pablo Lapunzina (Pérez de Nanclares, 2016).

La técnica de MS-MLPA (Figura 2) es un método semicuantitativo que permite evaluar el perfil de metilación. Consiste en una variante de la técnica MLPA en la que la detección del número de copias se combina con el uso de una enzima de restricción sensible a la metilación. Los productos resultantes generalmente se analizan en un secuenciador automático (electroforesis capilar) (Nygren, 2005), y la dosis génica se calcula comparando las señales de las mues-

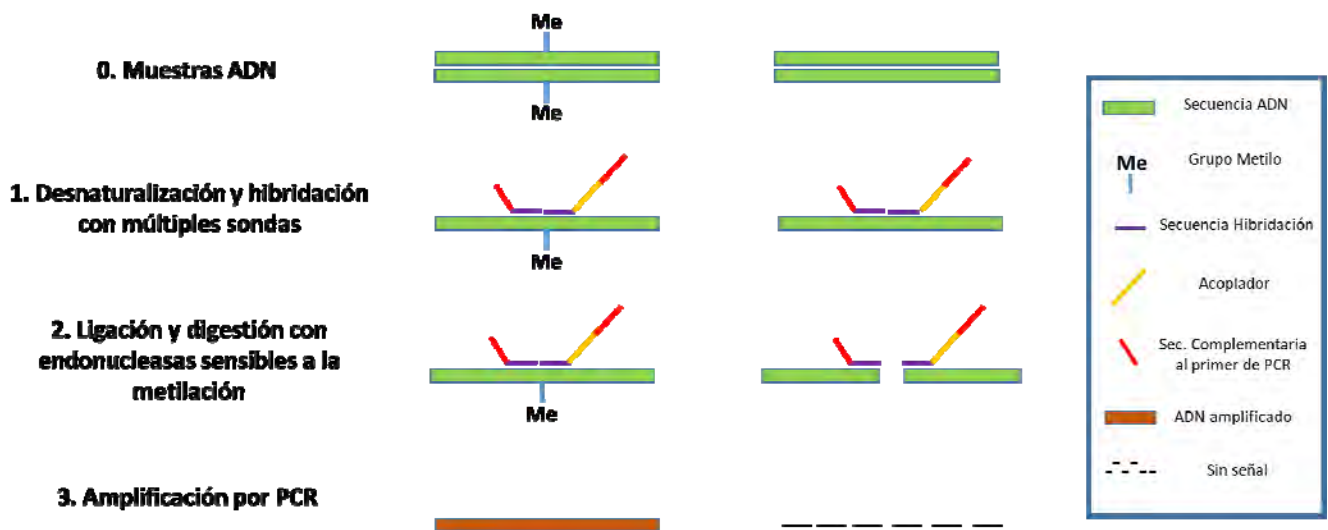


Figura 2. Esquema del flujo de trabajo realizado durante el análisis de metilación por MS-MLPA. Solo las sondas que se han hibridado y no han sido digeridas (por tanto localizadas en regiones metiladas), serán amplificadas.

tras no digeridas con los controles no digeridos. La comparación de las señales obtenidas permite determinar el nivel de metilación de las sondas que contienen el sitio de restricción *HhaI*. El análisis de los datos en bruto se puede llevar a cabo utilizando diferentes programas, algunos de ellos libres como el Coffalyser®, (MLPA-Holland, Países Bajos) o el desarrollado por el INGEMM (Instituto de Genética Médica y Molecular, Hospital Universitario La Paz de Madrid) (Romanelli, 2011).

La técnica MethyLight o qRT-MS-PCR (Figura 3) fue desarrollada por primera vez por Eads et al. en 1999 (Eads, 2000), se basa en la tecnología estándar de PCR específica de metilación, en el que el ADN modificado por tratamiento con bisulfito es amplificado usando cebadores específicos y sondas fluorescentes TaqMan™. Dado que el poder discriminatorio del método se asienta en una qPCR, se puede lograr una alta sensibilidad (una resolución de hasta un nucleótido) manteniendo una alta especificidad (Zhao, 2015). Además, MethyLight se ha utilizado para analizar simultáneamente la metilación del ADN obtenido de FFPE (Liu, 2011; Olkhov-Mitsel, 2012), de cfDNA (Muller, 2003), así como de sedimentos de orina (Reinert, 2012).

En 2010, He et al., desarrollaron la técnica MethyLight multiplex para analizar simultáneamente la metilación de múltiples genes en la misma muestra de ADN (He, 2010). El uso del elemento ALU, como

referencia y control interno, fue introducido en el procedimiento por el grupo de Bapat. Esta tecnología supera en precisión, reproducibilidad y en precio a la singleplex MethyLight, pues también reduce la cantidad de ADN de partida necesario para el análisis de múltiples genes. Esta técnica se ha aplicado con éxito para medir la metilación del ADN en tejido FFPE, tejido congelado fresco, biopsia de tejido y muestras de orina (Olkhov-Mitsel, 2014).

El análisis de temperatura de fusión de alta resolución (HRM) es una técnica que se basa en las características de disociación del ADN bicatenario durante el calentamiento. El MS-HRM (HRM sensible a metilación) mide la metilación del ADN sobre la base de que el ADN metilado y no metilado, al ser tratados con bisulfito, producen secuencias diferentes que generan productos de PCR con perfiles de temperatura de fusión marcadamente diferentes (Figura 3). La HRM puede estimar la proporción de metilación dentro de una muestra cuando se usan patrones de ADN convertidos en bisulfito (Wojdacz, 2012), pero la fiabilidad y sensibilidad de este método dependen de la captura de múltiples datos en cada ejecución y de una alta precisión en las evaluaciones pocillo a pocillo. Wojdacz y Dobrovic han optimizado protocolos de PCR para analizar la metilación del ADN por MS-HRM, favoreciendo la amplificación de la secuencia metilada (Wojdacz, 2008; Wojdacz, 2009; Wojdacz and Dobrovic, 2009). Considerando que el

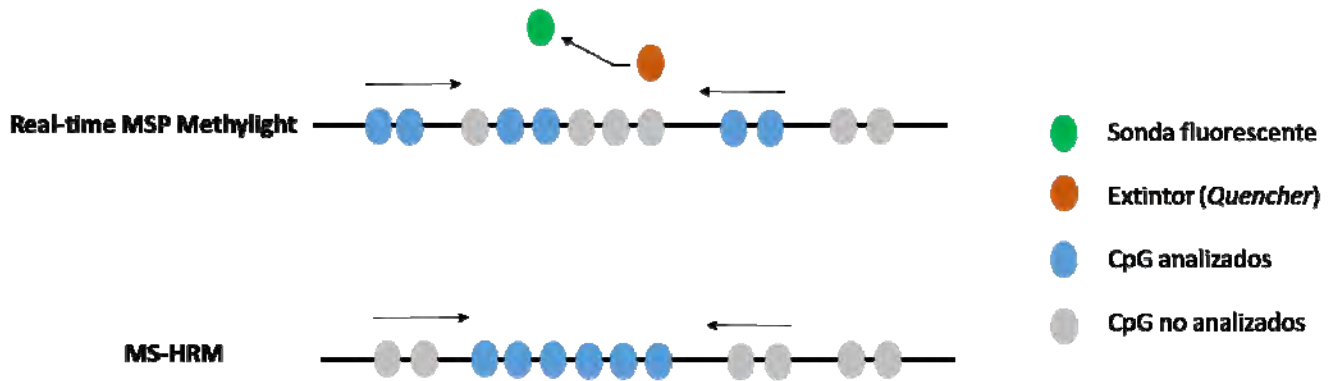


Figura 3. Esquema general de las técnicas utilizadas para medir la metilación del ADN en sitios CpG, todas ellas basadas en PCR. En el esquema simplificado se representan los dinucleótidos CpG como círculos, y las flechas indican la dirección de polimerización. El estado de metilación no está representado. Los círculos grises representan los CpGs que quedarían sin analizar en cada técnica correspondiente, mientras que los círculos azules representan los dinucleótidos CpGs evaluados en cada método. En el ensayo Real-time MSP MethyLight, el círculo verde representa la molécula fluorescente, y el naranja representa la molécula bloqueadora de la emisión.

análisis de HRM requiere productos de PCR cortos, esta técnica puede ser aplicada al estudio de la metilación de muestras en las que el ADN suele estar de por sí degradado, como son las muestras de tejido FFPE. La técnica MS-HRM es adecuada para laboratorios clínicos, ya que es una herramienta rápida y económicamente viable (Worm, 2001). Aunque no es específica de locus, tiene amplias aplicaciones prácticas en el diagnóstico de enfermedades de impronta genética como PWS, AS (White, 2007) y BWS (Romanelli, 2011; Tenorio, 2016).

La pirosecuenciación se basa en el principio conocido como "secuenciación por síntesis", en el cual los nucleótidos se adicionan secuencialmente y su incorporación se detecta, en tiempo real, gracias a la señal luminosa que produce la liberación de pirofosfato inorgánico (Tost and Gut, 2007a; Tost and Gut, 2007b) Este pirofosfato es transformado por la ATP sulfurilasa en ATP, que se acopla a la luciferina, formando un complejo que será utilizado por una luciferasa para producir oxiluciferina y la señal luminosa. Dado que el orden de adición de nucleótidos es conocido se puede determinar la secuencia de ADN molde.

La pirosecuenciación tiene una amplia gama de aplicaciones que incluyen la detección de polimorfismos de un único nucleótido (siglas en inglés, SNPs,) inserción/delecciones, número de copias de genes y análisis de la metilación del ADN (Zhao, 2015). Algunas de las plataformas de pirosecuenciación que se encuen-

tran en el mercado son PyroMark Q24, PyroMark Q24 Advanced o PyroMark Q96 ID de Qiagen, o el Secuenciador 454 de Roche, que es una plataforma de secuenciación de nueva generación y de alto rendimiento (Florea, 2015). Es una técnica fiable, rápida y de alto rendimiento que puede analizar simultáneamente, en aproximadamente 4 h, hasta 96 muestras de ADN modificadas con bisulfito. Esta técnica ha sido utilizada previamente en el análisis de la metilación del ADN en FFPE, sangre y cfDNA (Romanelli, 2011; Florea, 2015; Tang, 2016; Zmetakova, 2013).

### microARN

El análisis por RT-qPCR se ha convertido en una de las herramientas más relevantes en diagnóstico molecular en los laboratorios clínicos. Es por ello que esta es una de las herramientas más habituales para analizar microARN en el diagnóstico clínico rutinario, ya que proporciona alta sensibilidad, es rentable, permite el análisis simultáneo de múltiples secuencias y una amplia variedad de aplicaciones.

La qPCR requiere de un paso de retrotranscripción previo, y para ello podemos encontrar distintas opciones comerciales. Una opción es crear una cola poli A mediante la incubación de los microARN con una poliadenilasa. Posteriormente, se emplea un cebador poli-T para iniciar la RT. Este método permite realizar la qPCR con un cebador específico complementario al microARN de interés y un cebador universal. Este sistema es en el que se basan Sigma, Qiagen, Agi-



Tabla 1. microARNs propuestos como controles endógenos en ensayos de expresión relativa en RT-qPCR para detectar microARNs circulantes en biopsia líquida.

microARNs de referencia	Biofluido	Estudio en el que se ha usado el microARN(s) como gen de referencia	Referencia
miR-146b-5p, miR-142-3p y miR-24	Suero	Donantes sanos	(Marabita, 2016)
miR-17, miR-126, miR-484	Suero	Infección por Hepatitis C	(Marabita, 2016)
miR-26a, miR-221 y miR-22	Suero	Infección por virus de la Hepatitis B (HBV)	(Zhu, 2012)
miR-16 y miR-93	Suero	Cáncer Gástrico	(Song, 2012)
miR-16	Plasma	Ataxia de Friedreich	(Seco-Cervera, 2017)
	Suero	Fibromialgia	(Masotti, 2016)
miR-25-3p	Suero	Osteoporosis	(Chen, 2016)
miR-106b-5p, miR-93-5p y miR-25-3p	Suero	Cáncer Colorectal	(Niu, 2016)
miR-320a y miR-486-5p	Plasma	Sepsis	(Caserta, 2016)

lent, TaqMan Advanced miRNA Assays (ThermoFisher) y Exiqon, aunque este último incorpora una tecnología propia LNA (*Locked Nucleic Acid*), que le confiere una conformación que hibrida con mayor selectividad con su base complementaria. Otra de las opciones es el uso de cebadores en bucle (stem loops) parcialmente complementario al extremo 3' de un microARN usado por TaqMan™ MicroRNA Assays (ThermoFisher). O mediante la ligación de un oligonucleótido universal al extremo 3' del microARN para una posterior RT empleando un cebador universal complementario al adaptador incorporado (miRStar™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit, Arraystar).

Sin embargo, a la hora de escoger el método apropiado es necesario conocer la vía de maduración de microARN, ya que estos métodos han de ser capaces de discriminar entre los precursores del microARN (pri- y pre-microARN) y del microARN maduro. Dado que la cantidad de muestras clínicas a menudo son escasas y solo se puede extraer una cantidad muy limitada de microARN, se requieren amplificaciones del material en muchos casos, tanto para la RT-PCR

como para la NGS tras la construcción de las librerías.

Gran parte de los errores observados en los resultados de RT-PCR pueden ser debidos a errores en la incorporación de las bases por parte de la polimerasa durante la fase de amplificación, pero también se pueden deber a posibles errores en la ligación o hibridación de los cebadores.

Otra técnica para la detección de microARNs es la de micromatrices basada en hibridación. Esta tecnología se ha utilizado ampliamente para la detección de ARN mensajero y ADN. Pero la principal diferencia con ellos es el tamaño de los microARNs, y la posibilidad de que tanto los microARNs maduros como los pre-microARNs puedan hibridarse con las mismas sondas, lo que lleva a bajas especificidades y sensibilidades. Por último, podemos nombrar la NGS, que aporta una gran versatilidad en cuanto a la capacidad de identificar microARNs desconocidos previamente al estudio (García-Gimenez, 2017).

El uso de microarrays o Small RNA-seq para el análisis de microARNs requiere de mucho tiempo y, gene-

ralmente resulta costoso, por lo que son herramientas muy útiles para la investigación biomédica cuando se exploran los mecanismos implicados en la enfermedad, pero de utilidad limitada para el análisis de uno o pocos microARNs como biomarcadores, aunque bien es cierto que en los próximos años la simplificación de los protocolos y del análisis bioinformático de los datos obtenidos a partir de estas técnicas permitirá que los laboratorios clínicos las adopten para el análisis de biomarcadores epigenéticos en el diagnóstico clínico. Sin embargo, los equipos de qPCR parecen ser los que mayor implementación clínica inmediata presentan en la actualidad. De hecho, muchos ensayos IVD basados en RT-qPCR ya han sido aprobados por la Agencia para el control de Medicamentos y alimentos de los Estados Unidos (siglas en inglés FDA). Un inconveniente de este tipo de técnicas para la cuantificación relativa de expresión de uno o varios microARNs es que requiere de varios controles (endógenos de referencia, de hemólisis en muestras de sangre...) para garantizar la calidad de los ensayos de diagnóstico de microARNs. La aparición de nuevos kits de IVD basados en la detección de microARNs utilizando esta tecnología facilitará su incorporación a los laboratorios clínicos (García-Gimenez, 2017).

Por otro lado, los ensayos de RT-qPCR típicos requieren genes de referencia para normalizar los valores obtenidos para el gen diana, en este caso microARN. Varios autores han intentado encontrar los microARNs que pudieran servir como controles endógenos en el análisis de microARNs en biofluidos. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de microARNs usados como controles endógenos de referencia para la normalización de datos. En un futuro cercano, se espera que el desarrollo de nuevas técnicas que permitan la cuantificación absoluta, como la PCR digital (ddPCR), solucione este tipo de problemas y revolucione la aplicación de microARN como biomarcadores de enfermedades.

## Histonas

El análisis de variantes de histonas y de PTMs en histonas se ha realizado tradicionalmente en investigación mediante una combinación de técnicas de biología molecular que mayormente incluyen el *Western*

*blot*, la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés), la espectrometría de masas y los ensayos tipo ELISA. Generalmente, la combinación de diferentes técnicas proporciona la información más relevante sobre el código específico de variantes y modificaciones de histonas en un contexto celular concreto. No obstante, estas técnicas raramente se usan en la rutina clínica o tienen un escaso potencial diagnóstico/pronóstico. Debe considerarse que todos los métodos de purificación se dirigen al aislamiento de muestras de histonas o nucleosomas con propósito analítico, y se usan principalmente en investigación. Dichas técnicas están todavía lejos de producir muestras adecuadas para análisis de alto rendimiento, y una rápida aplicación a la rutina clínica. Sin embargo, se están produciendo avances en otras direcciones, principalmente aprovechando las potentes posibilidades de la tecnología de espectrometría de masas, como discutiremos más adelante.

La medida directa de las histonas en muestras de plasma, mediante inmunoensayos, es la manera estándar de detectar histonas circulantes, aunque empiezan a destacar nuevos métodos basados en la espectrometría de masas, como discutiremos en breve. En cuanto al análisis de ciertas PTM como biomarcadores de enfermedad, encontramos un ejemplo en el uso de la histona H3 citrulinada como biomarcador para enfermedades autoinmunes, como el lupus sistémico eritematoso o la artritis reumatoide (Frede, 2016). Otro ejemplo sería el uso de las histonas H3 y H4 acetiladas para monitorizar tratamientos en cáncer basados en inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACi por sus siglas en inglés) (Rigby, 2012). Dado que otros modificadores de histonas, como las metiltransferasas y desmetilasas, están siendo incorporados en ensayos clínicos para terapia en cáncer (Morera, 2016), se precisan métodos para evaluar la eficiencia de dichos tratamientos. En este sentido, las limitaciones técnicas de los kits ELISA, o su baja reproducibilidad, son los principales cuellos de botella para otorgarles un valor de confianza como biomarcadores frente a los inmunoensayos. Por lo tanto, aunque la rutina clínica incluye varios kits ELISA para el diagnóstico diferencial de desórdenes inmunológicos que producen liberación de proteínas nucleares al torrente sanguíneo, se están desarrollando

nuevos métodos que ostentan una especificidad mayor. Es el caso de las herramientas proteómicas de espectrometría de masas, que están siendo cada vez más utilizadas en las instalaciones clínicas, y cuya expansión se prevé para los próximos años (Vogeser y Seger, 2016). Esto se debe principalmente al hecho de que pueden reducir costes al reemplazar las técnicas basadas en inmunoensayos, que son más caras (Hetu, 2012). Estos métodos analíticos incrementarán su aplicación en el ámbito del laboratorio diagnóstico cuando se optimice el procesamiento de determinados bioespecímenes que por su complejidad son más difíciles de ser usados para el análisis de biomarcadores, como por ejemplo ocurre en los tejidos FFPE. Un trabajo reciente de Noberini et al., muestra que el análisis de PTM de histonas puede realizarse en tejidos FFPE, con una eficiencia similar a la obtenida mediante el análisis de muestras congeladas de tejido (Noberini, 2016a). En este contexto, las modificaciones de histonas podrían usarse como biomarcadores para el cáncer de mama, con los beneficios de usar muestras biológicas almacenadas a largo plazo en los archivos de anatomía patológica de los hospitales (Noberini, 2016b). El potencial de la espectrometría de masas puede aplicarse también a biopsias líquidas como fuente de histonas, como hemos mencionado antes; y están apareciendo nuevos métodos para mejorar la eficiencia del aislamiento de histonas a partir de suero, con vistas al análisis del perfil de sus PTMs en combinación con técnicas de espectrometría de masas (Reddy, 2017). Un buen ejemplo de la monitorización de tratamientos mediante este tipo de análisis lo encontramos en la evaluación de cambios en dicho perfil de modificaciones en células de leucemia sensibles a decitabina (Zhang, 2016). Otro ejemplo interesante es el uso que nuestro grupo ha hecho de la espectrometría de masas dirigida para detectar histonas circulantes (H<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>B) en muestras de plasma sin procesar, para utilizar estas histonas como biomarcadores para la predicción de un pronóstico fatal en pacientes de shock séptico (García-Giménez, 2017), constatándose su carácter de herramienta prometedora para ayudar a la toma de decisiones clínicas en el manejo de la sepsis, el cual todavía presenta numerosas dificultades en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) en todo el mundo

(Reinhart, 2017). No obstante, los métodos basados en espectrometría de masas, aunque están bien establecidos en el ámbito de la investigación, todavía deben ajustarse rigurosamente y demostrar su potencial, para la mayoría de los usos clínicos que se describen en este artículo (Vogeser and Seger, 2016).

## ANÁLISIS DE BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS DISPONIBLES EN EL MERCADO

La continua investigación en mecanismos epigenéticos que contribuyen a las enfermedades está aportando un gran número de posibles biomarcadores epigenéticos (Ferlin and Foresta, 2014; van Dijk, 2015; Bakulski, 2016; García-Giménez, 2016b) para su potencial uso clínico. Sin embargo, el número de biomarcadores que han sido implementados en la rutina clínica es todavía escaso. A continuación, revisaremos algunos ejemplos concretos de kits o métodos que, centrándose en explotar las propiedades de este tipo de biomarcadores, han llegado a comercializarse o utilizarse en la rutina clínica. En la Tabla 2 se resumen las principales características de los ensayos que se utilizan actualmente en clínica y que utilizan biomarcadores epigenéticos.

### Kits IVD basados en biomarcadores epigenéticos aprobados por la FDA

#### *Epi proColon® 2.0*

Epi proColon® 2.0 CE (Epigenomics AG, Alemania) es una prueba que utiliza la técnica de qPCR para detectar el nivel de metilación del gen de septina 9 en muestras de sangre periférica. Está diseñado para la detección temprana del cáncer colorrectal (CRC). Sin embargo, un resultado positivo obtenido en la prueba debe verificarse siempre mediante otros procedimientos de diagnóstico invasivos, como la colonoscopia o sigmoidoscopia (Lamb and Dhillon, 2017). En todos los estudios, esta prueba discriminó entre pacientes con CRC y controles sanos con una sensibilidad del 75-81% y con una especificidad para el CRC versus individuos sanos del 96-99%. Dos de los estudios de casos control, también compararon el rendimiento de Epi proColon® 2.0 CE con el de la prueba inmunoquímica fecal (FIT) (Jin, 2015) o la prueba del

Tabla 2. Ensayos epigenéticos basados en el análisis de la metilación del ADN y de microARNs.

Ensayo/Compañía	Bioespecimen	Descripción	Sn/Sp	Referencia
Epi proColon® 2.0 CE / Epigenomics Inc	Sangre periférica	Metilación del gen de septinag en muestras de sangre periférica.	Sn 75-81% Sp 96-99%	(Lamb and Dhillon, 2017)
Cologuard® / Exact Sciences	Sangre periférica	Niveles de metilación de los genes <i>N-Myc 4 downstream regulado (NDRG4)</i> y la <i>proteína morfológica ósea 3 (BMP3)</i> .	Sn 92,3% Sp 86,6%	(van Lanschot, 2017).
EPICUP™/ Ferrer	tejido fresco congelado/ FFPE	Compara el perfil de metilación (450K CpGs) específico del tumor, asignando un origen primario a la muestra de tumor desconocido.	Sn 97,7% Sp 99,6%	(Moran, 2016)
ThyraMIR™/ Interpace® Diagnostic Inc	Aspirados	Determinación de 10 microARN (miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, and miR-551b-3p) para el diagnóstico del cáncer de tiroides.	Sn 89% Sp 85%	(Kitano, 2012).
Rosetta GX Cancer Origin/ Rosetta Genomics	FFPE	Análisis del perfil de expresión de 64 microARNs analizados mediante plataforma de microArrays de Agilent y su comparación con el perfil de microARNs de 42 tumores distintos para determinar el origen del tumor.	Precisión del 85%	(Meiri, 2012).
Rosetta GX MI-lung™/ Rosseta Genomics Inc.	FFPE, biopsia con aguja fina, raspado bronquial y lavado bronquial	Análisis de una firma de 8 miARN mediante el uso de un análisis RT-qPCR para diferenciar el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y el carcinoma escamoso de pulmón no microcítico (CPCNP) no escamoso.	Sn 93,7% Sp 90%	(Gilad, 2012)
Rosetta GX MI-Kidney™/ Rosetta Genomics Inc.	FFPE	Análisis de una firma de 24 miARNs que permite diferenciar los 4 principales tipos histológicos de tumores renales primarios; oncocitoma benigno y los 3 subtipos más comunes de carcinomas de células renales (células claras, papilares y cromóforos).	Precisión del 95%	(Spector, 2013).

antígeno carcinoembrionario (CEA) en sangre periférica (que no es recomendable para cribado en el CRC), y con la prueba de sangre oculta en heces (gFOBT) (Toth, 2012).

En los distintos estudios clínicos realizados la sensibilidad mostrada por la prueba varía dependiendo de la etapa de progresión del CRC. De hecho, la sensibilidad fue menor para los estadios I que para los estadios II, III o IV. Las directrices en Europa en el screening de CRC (European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working, 2013) y en Asia-Pacífico (Sung, 2015) no incluyen todavía EpiProColon 2.0 CE, y recomiendan el uso de gFOBT o FIT cuantitativo como screening no invasivo. La colonoscopia se considera todavía el método estándar para detectar el cáncer

colorrectal y aún no se recomiendan las nuevas tecnologías de detección.

### **Test Cologuard® basado en el análisis de ADN en heces**

Las ventajas del kit Cologuard® (Cologuard®, Exact Sciences, Madison, WI, EE. UU.) estriban en la simplicidad de su uso y la capacidad de detección, con una sensibilidad del 92,3% y una especificidad del 86,6% (MDXHealth, 2014). Debido a que la exfoliación celular y la liberación del ADN en las heces se produce de forma continua, es posible detectar marcadores moleculares derivados de las células neoplásicas en el colon, lo que hace que la detección de CRC sea más precisa (Quintero, 2012; Morikawa, 2005).

Cologuard® consiste en varios abordajes de análisis que consisten en la determinación de la metilación específica del ADN y también la detección de hemoglobina en las heces (van Lanschot, 2017). Esta prueba mide específicamente los niveles de metilación de los genes *N-Myc 4 downstream regulado* (NDRG<sub>4</sub>) y la proteína morfogénica ósea 3 (BMP<sub>3</sub>).

Además, Cologuard® detecta la posible presencia de hasta 7 mutaciones en el exón 2 del gen KRAS (Imperiale, 2014), y los analiza a través de un algoritmo que proporciona el resultado final. Recientemente, la FDA aprobó el ensayo de metilación de NDRG<sub>4</sub> y BMP<sub>3</sub> como prueba de detección de CRC, puesto que ha demostrado una elevada sensibilidad y especificidad, pudiendo ser usado como una alternativa fiable a la colonoscopia (van Lanschot, 2017).

### **Test de diagnóstico epigenético en los laboratorios de diagnóstico genético**

Existen otras pruebas comerciales basadas en el análisis de la impronta genómica que están disponibles para los laboratorios clínicos. En particular, existen pruebas para el síndrome de Prader-Willi (PWS/AS), síndrome de Angelman y síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Existen kits comerciales para detectar el estado de metilación de loci implicados en varios síndromes como PWS/AS, BWS/Silver Russell, osteodistrofia hereditaria de Albright, pseudohipoparatiroidismo, disomía uniparental de la región 6q24, 7p12, 7q32 y 14q32, diabetes mellitus neonatal transitoria, gliomas y retinoblastoma. Estos kits son comercializados por diferentes compañías como MRC-Holland (Amsterdam, Países Bajos), Prevention Genetics Inc. (Marshfield, Wisconsin, EE. UU.), Premier Biosoft (Palo Alto, California, EE. UU.) y Eurofins Biomnis (Dublín, Irlanda), entre otros.

Otra aplicación que está captando el interés de los laboratorios de diagnóstico clínico es la prueba prenatal no invasiva (NIPT), también conocida como ADN prenatal libre (pcfDNA), para detectar ciertas anomalías cromosómicas en un feto. Durante este análisis, el ADN prenatal libre se extrae de una muestra de sangre materna para detectar la probabilidad de que el feto pueda tener alguna alteración cromosómica, como en el síndrome de Down, síndro-

me de Patau y el síndrome de Edwards. Este tipo de análisis también puede proporcionar información sobre el sexo del feto y el grupo sanguíneo, junto con el Rh. En relación a este tipo de análisis NIPT, recientemente se están usando regiones metiladas para diferenciar el cfDNA materno del fetal (Lim, 2014a; Lim, 2014b; Lee, 2013); por ejemplo, evaluando la metilación de los genes *HLCS*, *RASSF1A* (Lim, 2014a; Lim, 2014b) y *SERPIN5B5* (Lee, 2013).

En general, la mayoría de las técnicas utilizadas en los laboratorios clínicos para diagnosticar estos trastornos se basan en enzimas de restricción sensibles a la metilación y en el tratamiento químico del ADN con bisulfito, para PCR específica de metilación.

En cambio, EPICUP™ está basado en la tecnología de micromatrices e identifica el perfil de metilación específico del tumor, asignando un origen primario a la muestra de tumor desconocido a partir de tejido fresco congelado e incluso FFPE (Moran, 2016), y que ofrece Ferrer Hospitales como servicio de análisis bajo la certificación CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), que asegura la fiabilidad, la exactitud y la reproducibilidad de un ensayo en un laboratorio clínico (Kaul, 2017). Un estudio realizado con 10.481 muestras tumorales de origen conocido indicó que la especificidad de EPICUP para determinar el tipo de tumor era del 99,6% y su sensibilidad del 97,7%.

Por otro lado, existen algunos test IVD basados en microARNs con certificación CLIA, por citar algunos ejemplos comercializados: ThyGenX® Oncogene Panel y ThyraMIRTM, desarrollados por Interpace® Diagnostic Inc, (Parsippany, NJ, USA), y el test miR-View desarrollado por Rosetta® Genomics (Rehovot, Israel). El primero se desarrolló para el diagnóstico del cáncer de tiroides (Ferraz, 2011; Giordano, 2014), a partir de aspirados de punciones (Kitano, 2012) analizando la expresión de un panel de 10 microARN (miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, and miR-551b-3p) implementados en un algoritmo propio que permite ofrecer un diagnóstico. En un estudio prospectivo realizado en pacientes con nódulos tiroideos con una citología indeterminada, la realización de las pruebas combinadas con

ThyGenX® y ThyraMIR™ ofreció resultados con una buena sensibilidad del 89% (95% intervalo de confianza [CI], 73–97%) y una especificidad del 85% (95% CI, 75–92%) (Kitano, 2012).

Existen distintos test desarrollados por Rosetta Genomics, el Rosetta GX Cancer Origin, por ejemplo es un ensayo que analiza un perfil de microARNs para el diagnóstico de cánceres de origen desconocido. Por medio de una tecnología patentada se extraen 64 microARNs, a partir de muestras FFPE, y estos son analizados mediante una plataforma de micromatrices de Agilent Technologies (Rosenfeld, 2008; Meiri, 2012) usando una serie de clasificadores asignados a 42 tipos de tumores distintos que permiten proponer el origen del tumor primario. En un estudio de validación en una cohorte independiente, la precisión global del ensayo fue alta (85%), y en el 82% de las muestras analizadas fue posible establecer un único origen del tumor primario con un 90% de precisión (Meiri, 2012).

Por otra parte, el Rosetta GX MI-lung™ es un test diseñado para clasificar y diagnosticar pacientes con cáncer de pulmón. En esta prueba, se pueden utilizar muestras de FFPE, tejido fresco de biopsia, que incluyen biopsia FNA y lavado bronquial para determinar el nivel de expresión de 8 microARNs mediante un análisis RT-qPCR. Estos biomarcadores se utilizan para diferenciar el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer escamoso de pulmón no microcítico (CPNM) y del cáncer de pulmón no escamoso. La validación demostró una sensibilidad del 93.7% (95% CI, 90.8% to 95.8%) y una especificidad superior al 90%, para la identificación de los distintos subtipos histológicos del cáncer de pulmón (Gilad, 2012).

Finalmente, Rosetta GX MI-Kidney™ es un test que evalúa una firma de 24 microARN en un array de Agilent Technologies diseñado para proporcionar un diagnóstico diferencial rápido de cáncer renal a partir de muestra FFPE del tumor. Esta prueba de diagnóstico molecular *in vitro* permite diferenciar los 4 principales tipos histológicos de tumores renales primarios: oncocitoma benigno y los 3 subtipos más comunes de carcinomas de células renales (células claras,

papilares y cromóforos) con una precisión global del 95%, evitando así cirugías innecesarias (Spector, 2013).

En cuanto a las histonas, no existen métodos de diagnóstico aprobados por la FDA basados en la detección de histonas circulantes ni de PTM de histonas específicas detectadas en tejidos. Sin embargo, existe un kit de Histonas basado en un ELISA (<http://www.rapidtest.com>) que se ha diseñado para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. En particular, el kit permite la semicuantificación de autoanticuerpos contra histonas en suero humano. Dado que la presencia de histonas puede usarse en el diagnóstico diferencial entre el lupus eritematoso sistémico y otros desórdenes raros autoinmunes que también muestran proteínas nucleares en el suero como la esclerodermia u otras enfermedades del tejido conjuntivo, el potencial del kit depende de su combinación con otras herramientas diagnósticas.

## FUTUROS RETOS EN EL ANÁLISIS DE LOS BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN MUESTRAS CLÍNICAS

Las pruebas médicas que se realizan en los laboratorios clínicos son generalmente parte de un proceso médico más complejo: sus resultados complementan a la anamnesis y el estudio de los signos y síntomas, ayudando a orientar el diagnóstico, las acciones médicas y la toma de decisiones terapéuticas. El desarrollo de la tecnología facilita la determinación de nuevos biomarcadores, pero no todas las tecnologías llegarán a implementarse con el mismo éxito en los laboratorios clínicos debido a su complejidad, coste o dificultad en el manejo de los datos.

Como hemos visto en esta revisión, se han producido enormes avances en los últimos años en cuanto al desarrollo e implantación de los biomarcadores epigenéticos en la rutina clínica, pero todavía queda un camino largo por recorrer, así como algunos puntos clave por solucionar, como la necesidad de adoptar nuevas metodologías de trabajo (por ejemplo, tratamiento con bisulfito del ADN, o de aislamiento de exosomas para la detección de microARN). Uno de

los mayores retos está relacionado con las particularidades de los mecanismos epigenéticos, y es que todavía se necesita, en muchos casos, comprender en profundidad los procesos que regulan tanto a nivel molecular, como fisiológico y patológico. Este es el caso de los microARN, los cuales pueden regular multitud de genes y muchas veces su función se comprende en el contexto de un tejido biológico particular y no en otro, como por ejemplo al aparecer en un fluido biológico.

Otro reto adicional está relacionado con la adopción de los biomarcadores epigenéticos en un entorno clínico, donde no solo el personal del laboratorio debe conocer las tecnologías y metodologías para la determinación de este tipo de biomarcadores, sino que también el propio personal médico debe incrementar su conocimiento en relación al potencial de este tipo de biomarcadores y cómo implementarlos en su rutina de diagnóstico. Por supuesto se requiere de un esfuerzo común por parte de los laboratorios clínicos, la investigación clínica, y la industria del diagnóstico *in vitro* para la generación no solo de nuevos biomarcadores epigenéticos, sino también para el desarrollo y la adopción de las metodologías más manejables y sencillas posibles para adaptar los procedimientos a la rutina de un laboratorio de diagnóstico clínico. Por supuesto, todavía existen algunos cuellos de botella como el hecho de que no todos los hospitales y laboratorios clínicos pueden disponer de equipos de alto rendimiento, como el requerido para NGS, o un espectrómetro de masas. Sin embargo, este no será un problema en un futuro cercano, ya que se están abaratando este tipo de tecnologías y además la industria tiene gran interés en introducir nuevas aplicaciones y equipamientos en el entorno clínico.

La epigenética contribuirá decisivamente a la mejora de la medicina de precisión y la implementación de la teragnosis, mejorando la seguridad y la eficacia de los tratamientos. En este sentido, un gran número de iniciativas han sido anunciadas tanto en Europa como en los Estados Unidos. Por supuesto, las tecnologías epigenómicas y los biomarcadores epigenéticos empoderarán la medicina al refinar y mejorar la toma de decisiones clínicas, pero para ello también la revisión de las directivas y regulaciones sobre los disposi-

tivos médicos de diagnóstico *in vitro* debe prepararse acorde con estos avances tecnológicos (García-Gimenez, 2017).

## AGRADECIMIENTOS

J.L.G-G agradece al INCLIVA y a la GVA la financiación de los proyectos emergentes (GV/2014/132), así como a la Acción Estratégica en Salud AES2016 (ISCIII) por la financiación en un proyecto FIS número PI16/01036, co-financiado por los Fondos de Desarrollo Regional Europeos (FEDER). J.L.G-G agradece también su soporte al Consorcio Centro de Investigación en Red del Instituto de Salud Carlos III, CIBER-ISCIII. G P. M agradece al Ministerio de Economía y Competitividad la Ayuda Torres Quevedo (PTQ15-078899). J. B. G agradece a la GVA la ayuda otorgada dentro del Programa Contratación de Personal Técnico de Transferencia Tecnológica (APOTIP/2017/012). E. B. agradece al Ministerio de Economía y Competitividad la ayuda otorgada en el marco del Programa de Doctorado Industrial (DI16-08917). E.G.L agradece a la GVA la ayuda otorgada dentro del Programa Contratación de Doctores en Empresas de la Comunitat Valenciana (AEST2016/026). C.R-M agradece a la Universitat de València y a la Fundación INCLIVA la ayuda obtenida en el programa VLC-BIOCLINIC 2017. S.M.M. agradece a la GVA la financiación del proyecto emergente (GV/2016/109)

## REFERENCIAS

Andersen AM, et al. Current and Future Prospects for Epigenetic Biomarkers of Substance Use Disorders. *Genes*. 2015 Oct 14;6(4):991-1022. doi: 10.3390/genes6040991.

Appierto V, et al. A lipemia-independent NanoDrop ((R))-based score to identify hemolysis in plasma and serum samples. *Bioanalysis*. 2014 May;6(9):1215-26. doi: 10.4155/bio.13.344.

Arroyo JD, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America. 2011 Mar 22;108(12):5003-8. doi: 10.1073/pnas.1019055108.
- Bakulski K, et al. Epigenetic Research in Neuropsychiatric Disorders: the "Tissue Issue". *Curr Behav Neurosci Rep.* 2016;3(3):264-274. doi: 10.1007/s40473-016-0083-4.
- Balgkouranidou I, et al. SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Aug;54(8):1385-93. doi: 10.1515/cclm-2015-0776.
- Blondal T, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods.* 2013 Jan;59(1):S1-6. doi: 10.1016/j.jymeth.2012.09.015.
- Bohmann K, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution.* 2014 Jun;29(6):358-67. doi: 10.1016/j.tree.2014.04.003.
- Bulla A, et al. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreservation and biobanking.* 2016 Feb;14(1):29-38. doi: 10.1089/bio.2015.0045.
- Caserta S, et al. Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Scientific reports.* 2016 Jun 20;6:28006. doi: 10.1038/srep28006.
- Chen J, et al. Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. *Scientific reports.* 2016 Nov 08;6:36347. doi: 10.1038/srep36347.
- Choi JY, et al. Association between global DNA hypomethylation in leukocytes and risk of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2009 Nov;30(11):1889-97. doi: 10.1093/carcin/bgp143.
- Collinson P. Evidence and Cost Effectiveness Requirements for Recommending New Biomarkers. *Ejifcc.* 2015 Aug;26(3):183-9.
- Crujeiras AB, et al. DNA methylation map in circulating leukocytes mirrors subcutaneous adipose tissue methylation pattern: a genome-wide analysis from non-obese and obese patients. *Scientific reports.* 2017 Feb 17;7:41903. doi: 10.1038/srep41903.
- Debey-Pascher S, et al. RNA-stabilized whole blood samples but not peripheral blood mononuclear cells can be stored for prolonged time periods prior to transcriptome analysis. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2011 Jul;13(4):452-60. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.03.006.
- Devonshire AS, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2014 Oct;406(26):6499-512. doi: 10.1007/s00216-014-7835-3.
- Dietrich D, et al. Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2013 Mar;15(2):270-9. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.11.002.
- Duttagupta R, et al. Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PloS one.* 2011;6(6):e20769. doi: 10.1371/journal.pone.0020769.
- Eads CA, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic acids research.* 2000 Apr 15;28(8):E32.
- European Colorectal Cancer Screening Guidelines Working G, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: overview and introduction to the full supplement publication. *Endoscopy.* 2013;45(1):51-9. doi: 10.1055/s-0032-1325997.
- Ferlin A, Foresta C. New genetic markers for male infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014;26(3):193-8.
- Ferraz C, et al. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jul;96(7):2016-26. doi: 10.1210/jc.2010-2567.
- Florea A-M. Pyrosequencing and Its Application in



- Epigenetic Clinical Diagnostics. In: García-Giménez JL, editor. Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. Translational Epigenetic Series. Vol. 1. New York: Academic Press; 2015. p. 175–194.
- Frede A, et al. Colonic gene silencing using siRNA-loaded calcium phosphate/PLGA nanoparticles ameliorates intestinal inflammation in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016 Jan 28;222:86-96. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.021.
- Gao H, et al. Circulating histones for predicting prognosis after cardiac surgery: a prospective study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016 Nov;23(5):681-687. doi: 10.1093/icvts/ivw198.
- García-Gimenez J. Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. Vol. 1. JL G-G, editor.: Academic Press; 2015.
- García-Giménez JL, et al. Epigenetic Biomarkers: New Findings, Perspectives, and Future Directions in Diagnostics. In: García-Giménez JL, editor. Epigenetic Biomarkers and Diagnostics: Elsevier Inc.; 2016a.
- García-Giménez JL, et al. Chapter 1 - Epigenetic Biomarkers: New Findings, Perspectives, and Future Directions in Diagnostics. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Boston: Academic Press; 2016b. p. 1-18.
- García-Gimenez JL, et al. Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2017 Nov - Dec;54(7-8):529-550. doi: 10.1080/10408363.2017.1410520.
- García-Giménez JL, et al. A new mass spectrometry-based method for the quantification of histones in plasma from septic shock patients. *Scientific reports*. 2017 2017/09/06;7(1):10643. doi: 10.1038/s41598-017-10830-z.
- Gilad S, et al. Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012 Sep;14(5):510-7. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.03.004.
- Giordano TJ, Molecular testing for oncogenic gene mutations in thyroid lesions: a case-control validation study in 413 postsurgical specimens. *Hum Pathol*. 2014 Jul;45(7):1339-47. doi: 10.1016/j.humpath.2014.03.010.
- Glinge C, et al. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations. *PloS one*. 2017;12(2):e0167969. doi: 10.1371/journal.pone.0167969.
- Grasedieck S, et al. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*. 2012 Nov;26(11):2414-6. doi: 10.1038/leu.2012.106.
- He Q, et al. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010 Oct 01;202(1):1-10. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.05.018.
- Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Oct;50(10):1707-21. doi: 10.1515/cclm-2011-0935.
- Hetu PO, et al. Successful and cost-efficient replacement of immunoassays by tandem mass spectrometry for the quantification of immunosuppressants in the clinical laboratory. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012 Feb 01;883-884:95-101. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.10.034.
- Holmes EE, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. *PloS one*. 2014;9(4):e93933. doi: 10.1371/journal.pone.0093933.
- Hu Y, et al. Differential expression of microRNAs in the placenta of Chinese patients with severe pre-eclampsia. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(8):923-9. doi: 10.1515/CCLM.2009.228.
- Huang Y, et al. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PloS one*. 2010 Jan 26;5(1):e8888. doi: 10.1371/journal.pone.0008888.
- Imperiale TF, et al. Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2014 Apr 03;370(14):1287-97. doi:

10.1056/NEJMoa1311194.

Jin P, et al. Performance of a second-generation methylated SEPT9 test in detecting colorectal neoplasm. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015 May;30(5):830-3. doi: 10.1111/jgh.12855.

Joo JE, et al. The use of DNA from archival dried blood spots with the Infinium HumanMethylation450 array. *BMC biotechnology*. 2013 Mar 15;13:23. doi: 10.1186/1472-6750-13-23.

Jung M, et al. Bisulfite Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, Buffy Coat, FFPE Tissues, Microdissected Cells, Swabs, Sputum, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine. *Methods in molecular biology*. 2017;1589:139-159. doi: 10.1007/978-1-4939-9260-2\_260.

Kaul KL, et al. The Case for Laboratory Developed Procedures: Quality and Positive Impact on Patient Care. *Academic pathology*. 2017 Jan-Dec;4:2374289517708309. doi: 10.1177/2374289517708309.

Kirschner MB, et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS one*. 2011;6(9):e24145. doi: 10.1371/journal.pone.0024145.

Kitano M, et al. Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. *Thyroid*. 2012 Mar;22(3):285-91. doi: 10.1089/thy.2011.0313.

Kosaka N, et al. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer science*. 2010a Oct;101(10):2087-92. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.

Kosaka N, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*. 2010b Jun 04;285(23):17442-52. doi: 10.1074/jbc.M110.107821.

Kroh EM, et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010 Apr;50(4):298-301. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032.

Lamb YN, Dhillon S. Epi proColon(R) 2.0 CE: A Blood-Based Screening Test for Colorectal Cancer. *Molecular diagnosis & therapy*. 2017 Apr;21(2):225-232. doi: 10.1007/s40291-017-0259-y.

Legendre C, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of cell-free DNA identifies signature associated with metastatic breast cancer. *Clinical epigenetics*. 2015;7:100. doi: 10.1186/s13148-015-0135-8.

Lee DE, et al. Non-invasive prenatal testing of trisomy 18 by an epigenetic marker in first trimester maternal plasma. *PloS one*. 2013;8(11):e78136. doi: 10.1371/journal.pone.0078136.

Li Y, Tollefsbol TO. DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis. *Methods in molecular biology*. 2011;791:11-21. doi: 10.1007/978-1-61779-316-5\_2.

Li Z, et al. Methylation analysis of plasma cell-free DNA for breast cancer early detection using bisulfite next-generation sequencing. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016 Oct;37(10):13111-13119. doi: 10.1007/s13277-016-5190-z.

Lim JH, et al. Non-invasive detection of fetal trisomy 21 using fetal epigenetic biomarkers with a high CpG density. *Clin Chem Lab Med*. 2014a May;52(5):641-7. doi: 10.1515/cclm-2013-0802.

Lim JH, et al. Disease specific characteristics of fetal epigenetic markers for non-invasive prenatal testing of trisomy 21. *BMC medical genomics*. 2014b Jan 08;7:1. doi: 10.1186/1755-8794-7-1.

Liu L, et al. Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGFbeta2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *International journal of cancer*. 2011 Nov 15;129(10):2454-62. doi: 10.1002/ijc.25908.

MacLellan SA, et al. Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. *BMC Clin Pathol*. 2014;14:27. doi: 10.1186/1472-6890-14-27.

Mabert K, et al. Cancer biomarker discovery: current status and future perspectives. *International journal of radiation biology*. 2014 Aug;90(8):659-77. doi:

10.3109/09553002.2014.892229.

Marabita F, et al. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform.* 2016 Mar;17(2):204-12. doi: 10.1093/bib/bbv056.

Markopoulou S, et al. DNA methylation biomarkers in biological fluids for early detection of respiratory tract cancer. *Clin Chem Lab Med.* 2012 Oct;50(10):1723-31. doi: 10.1515/cclm-2012-0124.

Masotti A, et al. Circulating microRNA Profiles as Liquid Biopsies for the Characterization and Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome. *Mol Neurobiol.* 2016 Oct 29. doi: 10.1007/s12035-016-0235-2.

MDXHealth. MDxHealth (R) : MDxHealth Licensee Exact Sciences Receives FDA Approval for its Cologuard Colon Cancer Screening Assay. 2014. Disponible en: <http://mdxhealth.com/press-release/mdxhealth-r-mdxhealth-licensee-exact-sciences-receives-fda-approval-its-cologuard>

Meiri E, et al. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. *Oncologist.* 2012;17(6):801-12. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0466.

Migheli F, et al. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS one.* 2013;8(1):e52501. doi: 10.1371/journal.pone.0052501.

Moran S, et al. Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *The Lancet Oncology.* 2016. Doi: 10.1016/S1470-2045(16)30297-2

Morera L, et al. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clinical epigenetics.* 2016;8:57. doi: 10.1186/s13148-016-0223-4.

Moret I, et al. Assessing an improved protocol for plasma microRNA extraction. *PLoS one.* 2013;8(12):e82753. doi: 10.1371/journal.pone.0082753.

Morikawa T, et al. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in

the asymptomatic population. *Gastroenterology.* 2005 Aug;129(2):422-8. doi: 10.1016/j.gastro.2005.05.056.

Muller HM, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer research.* 2003 Nov 15;63(22):7641-5.

Niu Y, et al. Identification of reference genes for circulating microRNA analysis in colorectal cancer. *Scientific reports.* 2016 Oct 19;6:35611. doi: 10.1038/srep35611.

Noberini R, et al. Pathology Tissue-quantitative Mass Spectrometry Analysis to Profile Histone Post-translational Modification Patterns in Patient Samples. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 2016a Mar;15(3):866-77. doi: 10.1074/mcp.M115.054510.

Noberini R, et al. Mass-spectrometry analysis of histone post-translational modifications in pathology tissue using the PAT-H-MS approach. *Data in brief.* 2016b Jun;7:188-94. doi: 10.1016/j.dib.2016.02.028.

Nygren AO, et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic acids research.* 2005 Aug 16;33(14):e128. doi: 10.1093/nar/gni127.

Olkhov-Mitsel E, et al. Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer. *Epigenetics.* 2012 Sep;7(9):1037-45. doi: 10.4161/epi.21524.

Olkhov-Mitsel E, et al. Novel multiplex MethyLight protocol for detection of DNA methylation in patient tissues and bodily fluids. *Scientific reports.* 2014 Mar 21;4:4432. doi: 10.1038/srep04432.

Ozaki Y, et al. DNA methylation changes at TREM2 intron 1 and TREM2 mRNA expression in patients with Alzheimer's disease. *Journal of psychiatric research.* 2017 Sep;92:74-80. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.04.003.

Park NJ, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clinical cancer research : an official journal of*

- the American Association for Cancer Research. 2009 Sep 01;15(17):5473-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0736.
- Patnaik SK, et al. Detection of microRNAs in dried serum blots. *Analytical biochemistry*. 2010 Dec 01;407(1):147-9. doi: 10.1016/j.ab.2010.08.004.
- Peiró-Chova L, et al. High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. *Virchows Arch*. 2013 Dec;463(6):765-74. doi: 10.1007/s00428-013-1485-2.
- Pérez de Nanclares GL, P. Enfermedades de impronta – Guías de buena práctica clínica 2016. Available from: <http://www.ciberer.es/noticias/las-guias-de-buena-practica-clinica-en-las-enfermedades-de-impronta-disponibles-en-nuestra-pagina-web>
- Quillien V, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. 2012 Sep 01;118(17):4201-11. doi: 10.1002/cncr.27392.
- Quintero E, et al. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *The New England journal of medicine*. 2012 Feb 23;366(8):697-706. doi: 10.1056/NEJMoa1108895.
- Reddy D, et al. A novel method for isolation of histones from serum and its implications in therapeutics and prognosis of solid tumours. *Clinical epigenetics*. 2017;9:30. doi: 10.1186/s13148-017-0330-x.
- Reinert T, et al. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation. *PloS one*. 2012;7(10):e46297. doi: 10.1371/journal.pone.0046297.
- Reinhart K, et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. *The New England journal of medicine*. 2017 Aug 03;377(5):414-417. doi: 10.1056/NEJMp1707170.
- Relton CL, et al. From stem cells to the law courts: DNA methylation, the forensic epigenome and the possibility of a biosocial archive. *Int J Epidemiol*. 2015 Aug;44(4):1083-93. doi: 10.1093/ije/dyv198.
- Rigby L, et al. Methods for the analysis of histone H3 and H4 acetylation in blood. *Epigenetics*. 2012 Aug;7(8):875-82. doi: 10.4161/epi.20983.
- Romanelli V, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and uniparental disomy 11p: fine mapping of the recombination breakpoints and evaluation of several techniques. *European journal of human genetics : EJHG*. 2011 Apr;19(4):416-21. doi: 10.1038/ejhg.2010.236.
- Rosenfeld N, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*. 2008 Apr;26(4):462-9. doi: 10.1038/nbt1392.
- Rounge TB, et al. microRNA Biomarker Discovery and High-Throughput DNA Sequencing Are Possible Using Long-term Archived Serum Samples. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015 Sep;24(9):1381-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0289.
- Schmidt B, Weickmann S, et al. Improved method for isolating cell-free DNA. *Clinical chemistry*. 2005 Aug;51(8):1561-3. doi: 10.1373/clinchem.2005.051003.
- Seco-Cervera M, et al. Circulating miR-323-3p is a biomarker for cardiomyopathy and an indicator of phenotypic variability in Friedreich's ataxia patients. *Scientific reports*. 2017 Jul 12;7(1):5237. doi: 10.1038/s41598-017-04996-9.
- Shah JS, et al. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PloS one*. 2016;11(4):e0153200. doi: 10.1371/journal.pone.0153200.
- Shechter D, et al. Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols*. 2007;2(6):1445-57. doi: 10.1038/nprot.2007.202.
- Shen J, et al. Global DNA hypomethylation in leukocytes associated with glioma risk. *Oncotarget*.

- 2017 Sep 8;8(38):63223-63231. doi: 10.18632/oncotarget.18739.
- Song J, et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* 2012 Apr;57(4):897-904. doi: 10.1007/s10620-011-1981-7.
- Spector Y, et al. Development and validation of a microRNA-based diagnostic assay for classification of renal cell carcinomas. *Mol Oncol.* 2013 Jun;7(3):732-8. doi: 10.1016/j.molonc.2013.03.002.
- Sung JJ, et al. An updated Asia Pacific Consensus Recommendations on colorectal cancer screening. *Gut.* 2015 Jan;64(1):121-32. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306503.
- Tanaka K, Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2007 Apr 1;17(7):1912-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.01.040.
- Tang Q, et al. Blood-based DNA methylation as biomarker for breast cancer: a systematic review. *Clinical epigenetics.* 2016;8:115. doi: 10.1186/s13148-016-0282-6.
- Tenorio J, et al. Clinical and molecular analyses of Beckwith-Wiedemann syndrome: Comparison between spontaneous conception and assisted reproduction techniques. *American journal of medical genetics Part A.* 2016 Oct;170(10):2740-9. doi: 10.1002/ajmg.a.37852.
- Thakur BK, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research.* 2014 Jun;24(6):766-9. doi: 10.1038/cr.2014.44.
- Toraño EG, et al. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin Chem Lab Med.* 2012 Oct;50(10):1733-42. doi: 10.1515/cclm-2011-0902.
- Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature protocols.* 2007a;2(9):2265-75. doi: 10.1038/nprot.2007.314.
- Tost J, Gut IG. Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology. *Methods in molecular biology.* 2007b;373:89-102. doi: 10.1385/1-59745-377-3:89.
- Toth K, et al. Detection of methylated SEPT9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. *PloS one.* 2012;7(9):e46000. doi: 10.1371/journal.pone.0046000.
- Tsui NB, et al. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clinical chemistry.* 2002 Oct;48(10):1647-53.
- Valadi H, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology.* 2007 Jun;9(6):654-9. doi: 10.1038/ncb1596.
- van Dijk SJ, et al. Recent developments on the role of epigenetics in obesity and metabolic disease. *Clinical epigenetics.* 2015;7:66. doi: 10.1186/s13148-015-0101-5.
- van Lanschot MC, et al. Molecular stool testing as an alternative for surveillance colonoscopy: a cross-sectional cohort study. *BMC cancer.* 2017 Feb 07;17(1):116. doi: 10.1186/s12885-017-3078-y.
- Vickers KC, et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology.* 2011 Apr;13(4):423-33. doi: 10.1038/ncb2210.
- Vogesser M, Seger C. Quality management in clinical application of mass spectrometry measurement systems. *Clinical biochemistry.* 2016 Sep;49(13-14):947-54. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.07.005.
- Vrtačnik P, et al. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med.* 2014 May;52(5):589-608. doi: 10.1515/cclm-2013-0770.
- White HE, et al. Methylation-sensitive high-resolution melting-curve analysis of the SNRPN gene as a diagnostic screen for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Clinical chemistry.* 2007 Nov;53(11):1960-2. doi: 10.1373/clinchem.2007.093351.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation patterns.

- lation. *Nucleic acids research*. 2007;35(6):e41. doi: 10.1093/nar/gkm013.
- Wojdacz TK, et al. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nature protocols*. 2008;3(12):1903-8. doi: 10.1038/nprot.2008.191.
- Wojdacz TK, et al. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics*. 2009 May 16;4(4):231-4.
- Wojdacz TK, Dobrovic A. Melting curve assays for DNA methylation analysis. *Methods in molecular biology*. 2009;507:229-40. doi: 10.1007/978-1-59745-522-0\_17.
- Wojdacz TK. Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications. *Expert review of molecular diagnostics*. 2012 Jan;12(1):39-47. doi: 10.1586/ERM.11.88.
- Worm J, et al. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. *Clinical chemistry*. 2001;47(7):1183-9.
- Yap TA, et al. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014 May 15;20(10):2553-68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2664.
- Zanutto S, et al. Circulating miR-378 in plasma: a reliable, haemolysis-independent biomarker for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014 Feb 18;110(4):1001-7. doi: 10.1038/bjc.2013.819.
- Zernecke A, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science signaling*. 2009 Dec 08;2(100):ra81. doi: 10.1126/scisignal.2000610.
- Zhai R, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of cell-free serum DNA in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus. *Neoplasia*. 2012 Jan;14(1):29-33.
- Zhang C, et al. Quantitative proteomic analysis of histone modifications in decitabine sensitive and resistant leukemia cell lines. *Clinical proteomics*. 2016;13:14. doi: 10.1186/s12014-016-9115-z.
- Zhao FB, B. The Role of Methylation-Specific PCR and Associated Techniques in Clinical Diagnostics. In: García-Giménez JL, editor. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics. Translational Epigenetic Series. Vol. 1*. New York: Academic Press; 2015. p. 155-173.
- Zhu HT, et al. Identification of suitable reference genes for qRT-PCR analysis of circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Mol Biotechnol*. 2012 Jan;50(1):49-56. doi: 10.1007/s12033-011-9414-6.
- Zmetakova I, et al. Evaluation of protein expression and DNA methylation profiles detected by pyrosequencing in invasive breast cancer. *Neoplasma*. 2013;60(6):635-46. doi: 10.4149/neo\_2013\_082.
- Zubakov D, et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *International journal of legal medicine*. 2010 May;124(3):217-26. doi: 10.1007/s00414-009-0402-3.

Artículo recibido: 23 enero 2018

Artículo aceptado: 9 marzo 2018

Artículo publicado online: 14 marzo 2018

## ABSTRACT

### Epigenetic biomarkers: towards their incorporation into clinical routine

Clinical routine requires novel techniques in order to guarantee the identification of individuals in risk of developing a disease, in terms of an efficient and early detection; however, clinical management also needs tools that permit prediction of the long-term pathological evolution, as well as its response to any particular treatment. Currently, the main clinical indicators are based in imaging techniques and certain biomarkers, which show several limitations that, to some extent, biomarkers of an epigenetic nature have shown to overcome.

Comprehension of epigenetic mechanisms (i.e. DNA methylation, modulation of posttranslational histone modifications, and non-coding RNAs) has provided the apparition, in the last decades, of multiple new candidates for their use as diagnostic and prognostic biomarkers. Thus, in this review we describe some epigenetic biomarkers and several techniques and technologies which are being used for their detection.

In the near future, this type of technologies will be incorporated into clinical laboratories and, hence, the use of these biomarkers will be implemented into clinical diagnostic routine, contributing to the real application of theragnosis and improving precision medicine.

Keywords: Epigenetic biomarkers, DNA methylation, histones, histones posttranslational modifications, microRNAs, in vitro diagnostics (IVD) .