

11235
11

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Instituto Nacional de Cancerología, México

Metilación de genes supresores de tumor en
pacientes con cáncer Cervicouterino

T E S I S

Para obtener el título de especialista en:

Oncología Médica

Presenta: Dr. Ignacio Mariscal Ramírez

Asesor: Dr. Alfonso Dueñas González

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

METILACIÓN DE GENES SUPRESORES DE TUMOR EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICOUTERINO

Presenta: **Dr. Ignacio Mariscal Ramírez**

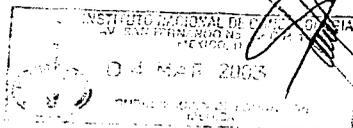
Para obtener el diploma de: **Oncología Médica**

Cede: **Instituto Nacional de Cancerología**

Tutor: **Dr. Alfonso Dueñas González**

SUBDIVISION DE INVESTIGACION
COMISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.

... a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico e impresa
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ignacio Mariscal Ramírez
FECHA: 17-04-03
FIRMA: [Firma]



AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alfonso Dueñas González

A la Bióloga Blanca Segura Pacheco

A la Maestra Lucía Taja Chayeb

A la Bióloga Aurora González Fierro

A la Maestra Catalina Trejo Becerril

A la Maestro Enrique Pérez Cárdenas

A la Bióloga Alma Chávez Blanco

A la Doctora María Zambrano

A Liz, Ángeles y Gris

INDICE

INTRODUCCIÓN	4
CÁNCER.....	4
CÁNCER CERVICOUTERINO	4
Virus del Papiloma humano	5
GEN Y EXPRESIÓN DE GENES	5
GENES SUPRESORES DE TUMOR	9
METILACIÓN.....	9
ADN Metiltransferasas	12
Islas CpG	13
METILACION Y SILENCIAMIENTO DE GENES.....	13
CAMBIOS DE LA METILACIÓN EN CÁNCER	16
ADN Metiltransferasas y cáncer.....	19
MEDICIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA.....	20
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
CRITERIOS PARA ENTRAR EL ESTUDIO.....	23
Criterios de inclusión	23
Criterios de exclusión	23
Violación de criterios de entrada.....	23
TAMAÑO DE MUESTRA	23
APOYO TÉCNICO REQUERIDO.....	23
MÉTODOS DE LABORATORIO.....	23
ANÁLISIS DE METILACIÓN.....	24
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES.....	27
INDICE	28
REFERENCIAS.....	29

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

El cáncer es una enfermedad genética tal como lo definen DeVita¹ y Holland², en la frase inicial de sus tratados. Ya que las anomalías en genes que controlan la proliferación celular, condicionan un crecimiento desenfrenado, lo que caracteriza a la célula maligna. También refiere Holland² que los oncólogos deben comenzar a entender las raíces moleculares de la enfermedad: genes, RNA mensajero y las proteínas que ellos producen. "En resumen, los oncólogos deben ser *un entendido* con las herramientas de la biología molecular"².

CÁNCER CERVICOUTERINO

El cáncer cervicouterino es uno de los cánceres más frecuentes entre las mujeres. A nivel mundial es la segunda topografía más frecuente, solo detrás del cáncer de mama. La incidencia mundial es de ~471,000 casos por año, la mayoría de los casos se presenta en países desfavorecidos económicamente.

En México es la neoplasia más frecuente, teniendo una incidencia de ~20,000 casos año y mortalidad de ~4,500 casos por año. En los Estados Unidos es la segunda neoplasia en cuanto a frecuencia ya que corresponde al 6% de todos los cánceres en mujeres, con una incidencia de ~16,000 casos y mortalidad ~5,000 casos por año.

La utilización de programas de tamizaje (screening) ha disminuido tanto la incidencia y mortalidad del cáncer cervicouterino¹.

El tipo histológico predominante del cáncer cervicouterino es el epidermoide, que alcanza hasta el 85 a 90% de los casos, seguido del adenocarcinoma y el adenoescamoso, comprendiendo 10 y 5% respectivamente. Aún cuando varios informes reportan que en Suecia³, Estados Unidos⁴, Canadá⁵ y Australia⁶ demuestran que estos dos últimos subtipos han aumentado su incidencia.

El pronóstico de los pacientes con cáncer cervicouterino se afecta de manera importante dependiendo de la extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico. En los países desarrollados, la gran mayoría de los casos se diagnostican en etapas tempranas (>90%)⁷ dado el uso extensivo de el papanicolaou. Desgraciadamente en México, a pesar de los esfuerzos por el uso generalizado del papanicolaou, no se ha logrado abatir la incidencia de etapas avanzadas.

Los tratamientos estándar para el CaCu, en etapas tempranas consiste ya sea en cirugía o radioterapia con supervivencia a 5 años de hasta el 80%; mientras que para las etapas avanzadas el tratamiento estándar consiste en quimiorradioterapia concomitante

Virus del Papiloma humano

El virus del papiloma humano es agente etiopatogénico más importante del cáncer cervicouterino. Desde hace más de treinta años, Kremsdorf⁸ describió los primeros tipos de VPH y los relacionó inicialmente con lesiones benignas. Mientras que Crum⁹ relacionó el virus con lesiones invasoras, lo confirmó en su trabajo Munger¹⁰. Se ha estimado que más del 75% de los pacientes con cáncer cervicouterino tienen presencia del genoma del VPH¹¹.

El VPH es uno de los virus más frecuentemente transmitidos por vía sexual. De Villiers¹² ha confirmado que de los más de ochenta tipos de virus de papiloma humano, solamente cuarenta infectan el tracto genitourinario. Kjaer¹³ ha confirmado que la infección por VPH es común en las mujeres jóvenes, pero estas infecciones son transitorias, y existen altas tasas de adquisición y eliminación del virus.

Aún cuando la mayoría de las infecciones son transitorias, los tipos de virus de papiloma humano se han dividido, en virus de alto y bajo grado para el desarrollo de cáncer. Dentro virus de alto riesgo se han incluido entre 13 a 19 tipos, siendo los tipos más importantes el 16 y el 18, pero también los tipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, y 58^{14,15,16,17} se encuentran dentro de los de alto riesgo.

La infección del VPH precede el desarrollo tanto de lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado, así como la infección por VPH de alto grado es un excelente predictor de lesiones de alto grado subsecuentes en mujeres jóvenes principalmente.

El VPH tipo 16 ha sido ampliamente relacionado con el cáncer cervicouterino, Durst¹⁸ encontró que este virus se encontraba en el 61% de las biopsias de CaCU de pacientes alemanas, pero solamente en el 35% de pacientes provenientes de Brasil y de Kenia. En un estudio más reciente, Muñoz¹⁹ demostró en un estudio multicéntrico que el VPH 16 se encontró en el 54% de los pacientes seguido del VPH 18 con un 11%.

GEN Y EXPRESIÓN DE GENES

El gen es la unidad fundamental de herencia y "determinante" de todos los fenotipos. Inicialmente se consideraba que el ADN de una célula humana normal

contenia entre 50,000²⁰ y 90,000²¹ genes. Pero actualmente se ha estimado que solamente pudieran ser ~30,000²² genes, esta disminuci3n en el estimado total de genes, se basa el conocimiento de la secuencia total del cromosoma 22²³, y del cromosoma 21²⁴; adem3s Ewing²⁵ hizo un modelo estadístico mediante el que estimaron que existen ~35,000 genes, Crolius²⁶ encontr3 mediante un modelo similar al de Ewing que pudiera haber entre 28,000 y 34,000 genes. Y solamente una fracci3n de 3stos se usa (o se encuentra expresado). Finalmente la secuenciaci3n del genoma revel3 que existen ~30,000²⁷.

Existe un concepto denominado "*Dogma central de la biología molecular*" descrito desde la d3cada de los setentas por Crick²⁸, el cual se refiere a que un gen ejerce sus efectos mediante la transcripci3n de su ADN hacia un ARN mensajero (mRNA), el cual, es traducido en una proteina, y esta es el efector final de la acci3n de gen.

Es por ello, que en biología molecular se investiga la "expresi3n" o la "activaci3n" del gen. Pero esto es muy complejo ya que pueden existir alteraciones en el proceso de transcribir el ADN en ARN, o en la traducci3n de ARN en proteina (Figura 1).

Este dogma central deriva de principios muy importantes:

1. El ADN debe estar en el n3cleo protegido del citoplasma
2. Se pueden obtener muchas copias de ARN a partir de una sola de ADN
3. La regulaci3n de la expresi3n del gen puede ser realizada por controles específicos, de cada elemento en la senda entre el ADN y proteínas.

En su descripci3n inicial, Crick postul3 varios tipos de transferencias de la informaci3n, la m3s importante es la que se describi3 arriba, pero existen dos grupos de transferencia m3s.

En resumen las propuestas de Crick son:

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
ADN a ADN	ARN a ADN	PROTEINA a PROTEINA
ADN a ARN	ADN a PROTEINA	PROTEINA a ARN
ARN a PROTEINA		PROTEINA a ADN
ARN a ARN		

En 1970, Temin y Mizutani²⁹ propusieron la posibilidad de obtener ADN a partir del ARN, lo cual se ha confirmado al demostrarse con los retrovirus. Y la transferencia proteina-proteina se ha propuesto como mecanismo de los priones.

LOS COMPONENTES FUNCIONALES DEL GEN

Cada gen se compone de varios componentes estructurales y funcionales, que se encuentran implicados en una faceta diferente del proceso de la expresi3n de gen.

Existen dos unidades funcionales principales: la región del promotor y la región de codificación.

La región del promotor, descrita desde 1981³⁰, controla cuando y en qué tejido que un gen se debe de expresar. Por ejemplo, el promotor del gen de la hemoglobina permite la expresión de la región de codificación en los eritrocitos, mientras que en las células del cerebro no lo permite.

En el ADN de la región del promotor del gen, hay elementos estructurales específicos, que permiten que el gen para sea expresado sólo en una célula apropiada. Estos son los elementos, que indican al eritrocito a transcribir ARNm a partir del gen de la hemoglobina. Estas estructuras son elementos "cis" (cerca) ya que ellos residen en la misma molécula del ADN que el gen.

En algunos otros, existen otros elementos "cis" específicos al tipo tejido, llamados "enhancers"^{31,32} (potenciadores), y estos residen en la misma molécula del ADN, pero en distancias magníficas de la región de la codificación del gen.

En algunas células, los elementos "cis" se unen a proteínas, responsables de transcribir el gen. A estas proteínas se llama factores "trans" (lejos), ya que ellos residen en el núcleo de la célula, separados del ADN que contiene al gen,

La estructura de las proteínas es especificada por la región de "codificación" de gen. La región de la codificación contiene la información que dirige a un eritrocito para armar los aminoácidos en orden apropiado para hacer la proteína de hemoglobina. En la región de la codificación de un gen, la sucesión lineal de nucleótidos "codifica" al aminoácido de la proteína. Este código genético está en la forma del triplete, para que cada grupo de tres nucleótidos codifique un solo aminoácido. Los 64 tripletes que pueden ser formados por cuatro nucleótidos, exceden el número de aminoácidos usados para hacer las proteínas; esto hace que el código permita que algunos aminoácidos sean codificados por varios tripletes³³, así mismo existen tripletes de inicio y de paro de codificación.

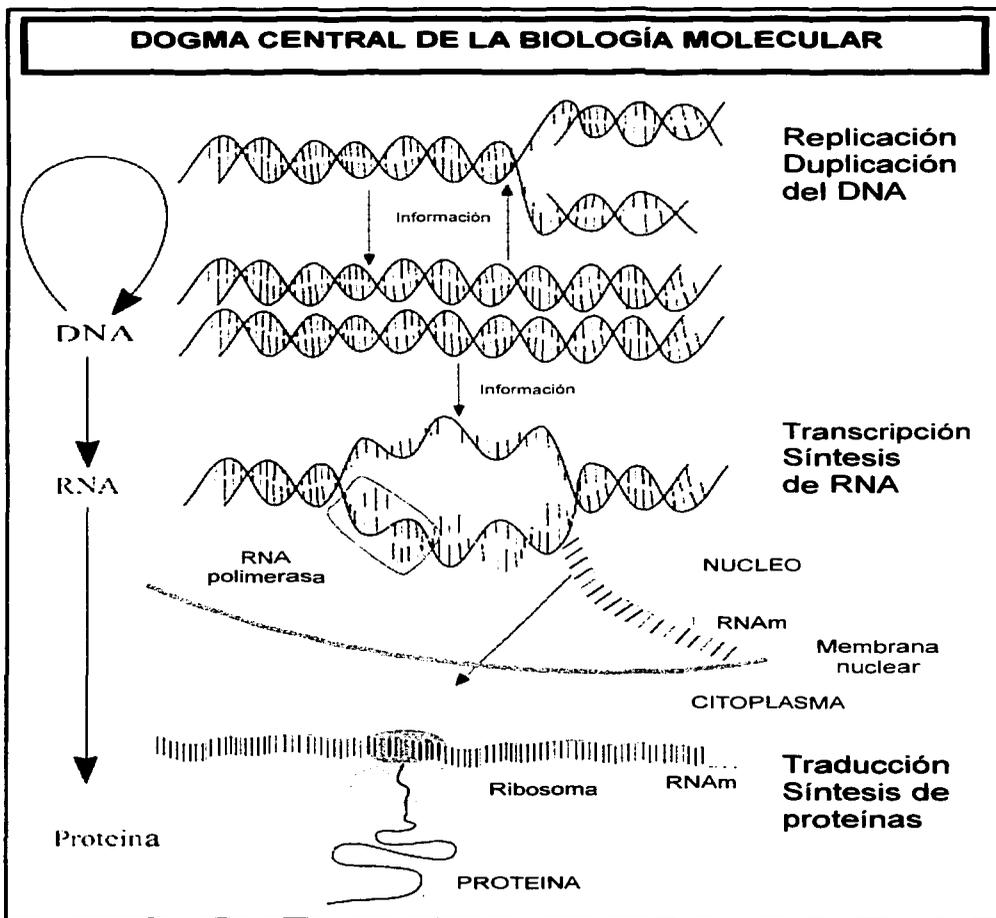


Figura 1. Dogma central de la biología

GENES SUPRESORES DE TUMOR

La base genética para el desarrollo del cáncer, ha sido a partir de una hipótesis que se ha formulado con el apoyo del conocimiento médico a través de un siglo. Pero en los últimos 25 años solamente es cuando se ha podido determinar que existen bases que sustentan tal hipótesis. Se han identificado dos tipos de genes de gran importancia para el desarrollo del cáncer.

Se han identificado más de 50 diferentes protooncogenes (por diversas técnicas). En términos generales, los protooncogenes tienen papeles importantes en varias de las vías reguladoras del crecimiento, y sus productos proteicos se distribuyen virtualmente en todos los espacios subcelulares. El oncogen es una variante del protooncogén que resulta en ganancia de función, producto de mutaciones puntuales, rearreglo de cromosomas o amplificación del gen en las sucesiones del protooncogén. En la gran mayoría de los cánceres, las mutaciones en los protooncogenes, surgen en las células somáticas; aún cuando mutaciones en células germline también son factibles (p.ejem. RET)

Los Genes Supresores de Tumor (GST) son definidos por su capacidad de inactivar el desarrollo del cáncer. Existen en la actualidad más de treinta GST descritos e implicados directa y claramente en el desarrollo del cáncer.

Al igual que con los oncogenes y protooncogenes; las funciones de los GST son múltiples, existe un grupo especial, el cual es el encargado de la vía de reparación del ADN; alteraciones en este grupo son las más relacionadas con un gran grupo de cánceres.

Mientras que los productos proteicos de varios GST, son probablemente implicados de forma directa en la inhibición del crecimiento o de la diferenciación. Las proteínas reparadoras del ADN pareciera que tienen un papel pasivo, pero la inactivación de estas, da como resultado una tasa aumentada de mutaciones en otros genes celulares, inclusive en protooncogenes y otros GST.

METILACIÓN

La metilación del DNA es un proceso complejo en el cual alguna de las tres DNA metiltransferasas (Dnmts) cataliza la adición de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina, obteniendo este grupo metilo del donador universal (de grupos metilos) la S-Adenosil-L-Metionina (SAM)³⁴.

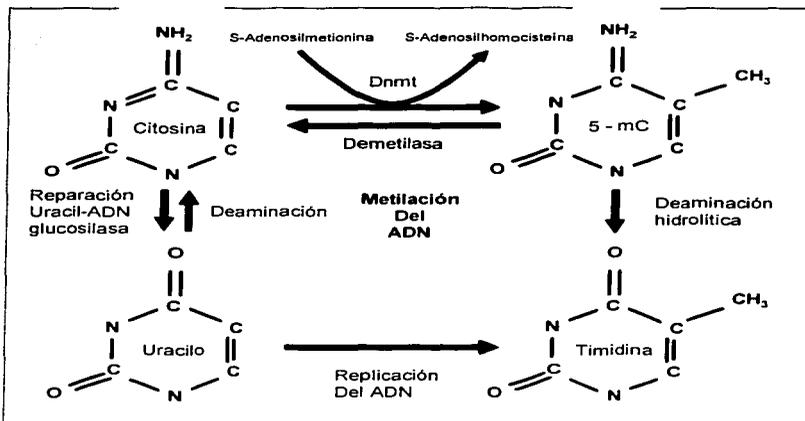


Figura 2. Metilación del ADN

Esta modificación ocurre predominantemente en el dinucleótido formado por Citosina y Guanina (CpG), y de manera predominante entre el genoma de los mamíferos.

Actualmente se conocen tres Dnmts catalíticamente activas en el humano, a saber Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b. Aparentemente cada una de ellas juega un papel distinto y crítico en la metilación del ADN.³⁵

La metilación del DNA influye profundamente en muchos procesos, entre los cuales se incluyen entre otros: regulación transcripcional (incluida la inactivación parental o imprinting), estabilidad genómica, modulación de la estructura de la cromatina e inactivación del cromosoma X.^{36,37,38}

Estos diferentes procesos, aparentemente comparten algunas características en común; lo que se puede incluir dentro de lo que se ha definido como epigenética. Lo que corresponde a modificar la expresión del DNA, pero sin modificar la secuencia del DNA.

Los patrones de metilación del DNA, no son eventos distribuidos aleatoriamente, sino por el contrario se encuentran perfectamente controlados. Existen regiones que generalmente se encuentran hipometiladas o hipermetiladas³⁸.

Por ejemplo, los patrones de metilación cambian dramáticamente durante el desarrollo del embrión. La mayoría del genoma es desmetilado después de la

fecundación; y es seguido por metilación *de novo* hasta que se logra la implantación del embrión. Más sin embargo no todas las secuencias del genoma se desmetilan posterior a la fecundación, ni todas las secuencias posteriormente sufren metilación *de novo*. Esto enfatiza que la metilación es un proceso específico y bien controlado.³⁹

El patrón de metilación es exquisitamente controlado durante el desarrollo temprano dando como resultado diferentes patrones de metilación. El control estricto de la metilación del DNA es liberado en las células malignas, las que se caracterizan por estados de metilación invertidos. Los genes asociados a islas de CpG, en particular los genes supresores de tumor (o genes relacionados), frecuentemente se encuentra hipermetilados y esto se asocia con silenciamiento de estos genes. Además, la metilación comúnmente es involucrada como un evento causal crítico en el silenciamiento de los GST.

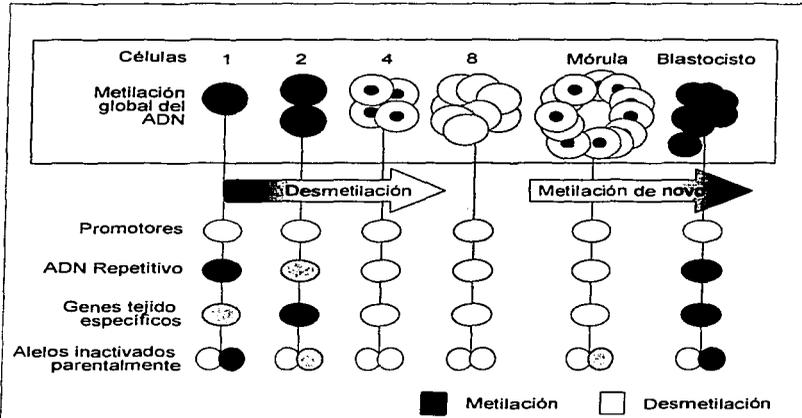


Figura 3. Cambios en el patrón de metilación durante el desarrollo embrionario

La importancia de la metilación se ha evaluado en modelos *in vivo*. Inicialmente se vio que la inhibición de la metilación en embriones de ratón conducía a la muerte de los mismos^{40 41}. Más recientemente, se ha demostrado el papel de la metilación en los humanos; se han descrito unos síndromes en los cuales el proceso de la metilación está comprometido, estos síndromes son: X frágil, ATRX, Rett e ICF.⁴²

La alteración en los patrones de metilación, es uno de los hallazgos más comunes de las células transformadas, e inclusive algunos estudios han demostrado que los cambios en la metilación son eventos tempranos en el proceso de la

tumorigénesis y contribuyen directamente a la transformación. Además la maquinaria encargada de mantener la metilación se encuentra totalmente alterada y disfuncional, lo que condiciona que los patrones de metilación sean revertidos, dando como resultado hipometilación global del DNA e hipermetilación de las islas CpG DNA.^{36,37,38.}

Existe información reciente, que permite conocer como los patrones de metilación son establecidos durante el desarrollo de los mamíferos y mantenidos en las células somáticas.

ADN Metiltransferasas

Las Dnmts catalíticamente activas interactúan con las desacetilasas de histonas, y el uso de inhibidores de cada uno de estos procesos, revelan que ambos procesos actúan de manera conjunta para reprimir la transcripción.^{43,44}

Varios estudios en plantas, ratones y humanos, usando modelos con mutaciones en la ingeniería de la remodelación de la cromatina, demuestran que la estructura de la cromatina puede modificar los patrones de metilación.⁴⁵

La ADN metiltransferasa 1 (Dnmt1) fue la primer enzima de su grupo, aislada en los mamíferos. En la década de los ochentas, Bestor^{46,47,48,49,35} describió esta Dnmt en ratones; y algunos años más tarde, Yen⁵⁰ describió su homólogo humano y codificado en 19p13.2. Más importantemente, Dnmt1 es la única en la cual se ha estudiado y establecido su funcionamiento.^{51,52}

De manera general se considera que las Dnmts están compuestas de dos partes, una región variable amino terminal y una región relativamente constante carboxi terminal. Dnmt1 tiene la región amino terminal más larga de todas las Dnmts humanas.

La región amino terminal tiene varios papeles funcionales: regulación de la actividad del dominio catalítico de la región carboxi terminal, localización nuclear, unión al zinc e intermediario entre las interacciones proteína – proteína. La región carboxi terminal, comprende el dominio catalítico, el cual es común a todas las Dnmts.^{35,53}

La actividad bioquímica así como las propiedades enzimáticas de la Dnmt1 han sido extensamente estudiadas. Dnmt1 tiene una gran preferencia hacia el ADN de doble cadena hemimetilado, sobre el ADN doble cadena desmetilado. Es por ello que gracias a esta característica Dnmt1 es considerada comúnmente como metiltransferasa de mantenimiento.^{54,55,56,57,58}

Existe diferencia en la localización celular de la Dnmt1 durante las diferentes etapas del ciclo celular; por lo general su localización es subnuclear, pero durante G1 y G2 se demuestra una distribución nucleoplásmica difusa, y durante la fase S se asocia con los sitios de síntesis del ADN (focos de replicación).^{59,60} Esto apoya el hecho de que Dnmt1 sea considerada como metiltransferasa de mantenimiento.

La expresión de Dnmt1 debería de correlacionarse perfectamente con el estado replicativo de las células; se ha demostrado que los niveles de Dnmt1 se encuentran muy elevados tanto en la placenta como en el pulmón. Pero se supondría que en tejidos con tasas replicativas bajas estos niveles deberían así mismo ser bajos, pero en tejidos con estas características (v. Gr. Corazón y cerebro) muestran niveles muy elevados⁵⁰, esto sugiere que la Dnmt1 tiene otros papeles además de mantener la metilación.

Islas CpG

Las islas CpG tienen una alta frecuencia de di nucleótidos CpG, aproximadamente cinco veces mayor que el resto del genoma, y corresponden del 1 al 2% del mismo. Estas islas miden desde ~ 200 pb hasta algunos miles de longitud⁶¹.

Se ha estimado que existen ~ 29 000 islas CpG en el genoma y aproximadamente del 50 al 60% de todos los genes contienen una isla asociada al promotor⁶².

Aún cuando la mayoría de las islas CpG se encuentran protegidas de la metilación en la etapa embrionaria, algunas islas CpG son sometidas a metilación de diferenciación alélica, v. gr. Las islas del cromosoma X inactivo.

METILACION Y SILENCIAMIENTO DE GENES

Clarck y Melki⁶³, arguyen que la metilación no es el evento inicial, que ocasiona el silenciamiento del gen en cáncer; sino mas bien la metilación es una consecuencia de un silenciamiento inicial del gen; un papel similar ocurre en mantener apagado el cromosoma X inactivo.

Dentro de los cambios en la metilación global del ADN que ocurren en el desarrollo temprano existen diferencias regionales específicas. De hecho no todas las islas CpG son susceptibles de metilación, aparentemente existe una segmentación respecto a la metilación de las islas CpG⁶⁴. Los compartimentos aparentemente coinciden con regiones de inactividad genética, mientras que los compartimentos desmetilados coinciden con regiones de actividad génica.

Secuencias que comprenden hasta el 35% del genoma generalmente se encuentra hipermetilados, son promotores y regiones de genes tejido específico⁶⁵.

Uno de los papeles más importantes de la metilación en los mamíferos está relacionado con el control de la expresión génica. Esto debido a que la metilación dentro del gen (promotores y enhancers) suprime su función.

La metilación induce supresión del gen por varios mecanismos: 1) Bloqueando los factores de transcripción (figuras 4 y 5)^{66,67}, 2) Formación de un estado inactivo de la cromatina (figura 6)^{68,69}. A pesar de ello permanece poco claro el mecanismo mediante el cual la metilación produce inactivación genética.

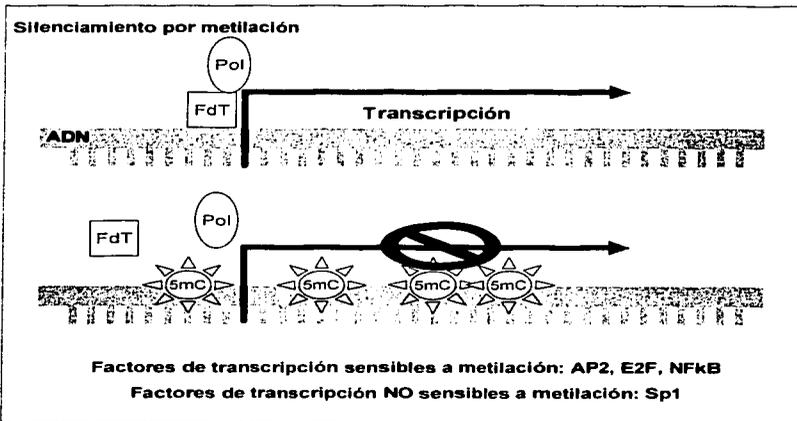


Figura 4. Silenciamiento por bloqueo de factores de transcripción

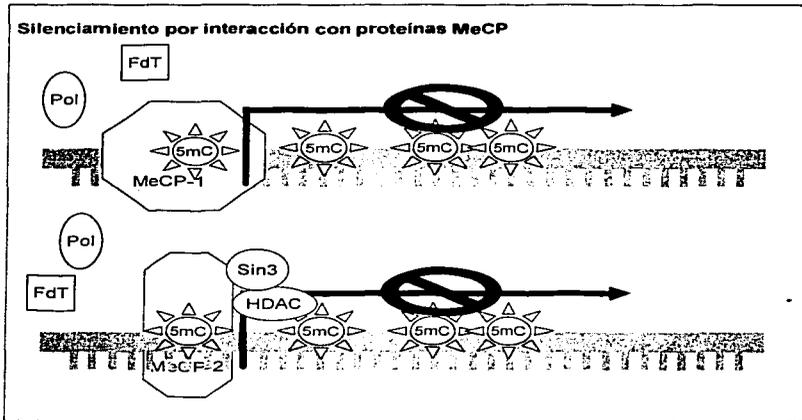


Figura 5. Silenciamiento por bloqueo de MeCP

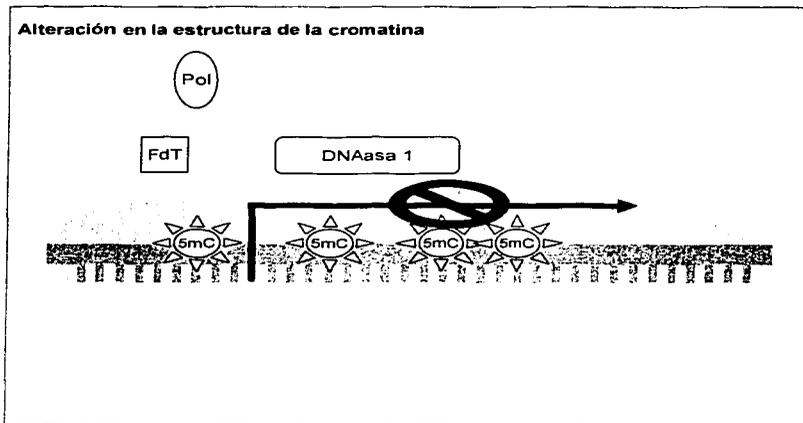


Figura 6. Silenciamiento por alteración de la estructura de la cromatina

CAMBIOS DE LA METILACIÓN EN CÁNCER

En contraste a las células normales, el patrón de metilación en las células malignas presenta grandes cambios.^{70,71,72} El grueso del genoma en las células malignas se encuentra hipometilado, en especial las regiones que normalmente se encuentran hipermetiladas; de manera contrastante, las islas CpG que normalmente se encuentran desmetiladas, en el cáncer generalmente se hipermetilan y silencian.

El mecanismo mediante el cual se da la hipometilación en el cáncer, es poco claro; pero se han propuesto múltiples posibilidades:

- 1) Dieta insuficiente en folatos. Esto se basa en que se ha demostrado que los hígados de ratones deficientes en folatos presentan hipometilación del genoma e incremento del rompimiento del ADN; además estas ratas desarrollan cáncer hepático.^{73,74,75}
- 2) Desregulación de las demetilinasas. Se ha propuesto que puede existir una desregulación de las enzimas encargadas de la desmetilación o falta de actividad de las ADN metiltransferasas (enzimas encargadas de la metilación)⁷⁶.

A pesar de que la vía que conduce a la hipometilación es desconocida, es claro que un sello distintivo de la mayoría de los cánceres es la hipometilación. Además, se ha propuesto que la hipometilación en el cáncer da como resultado la activación de oncogenes,^{77,78,79} activación de retrotransposones⁸⁰ y/o inestabilidad cromosómica^{81,82}.

La evidencia de la activación de oncogenes, por desmetilación gen específica en cáncer es pobre, pero se ha reportado hipometilación de algunos oncogenes como cMYC y H-RAS⁸³.

La hipometilación se ha reportado como responsable de la activación de MAGE y genes relacionados⁸⁴. Estos genes son específicos de células germinales y los promotores de estos genes normalmente se encuentran metilados y por ende silenciados en todos los tejidos somáticos de los adultos, pero se puede activar de manera aberrante en algunos tumores. Un ejemplo se detalla en la figura 7.

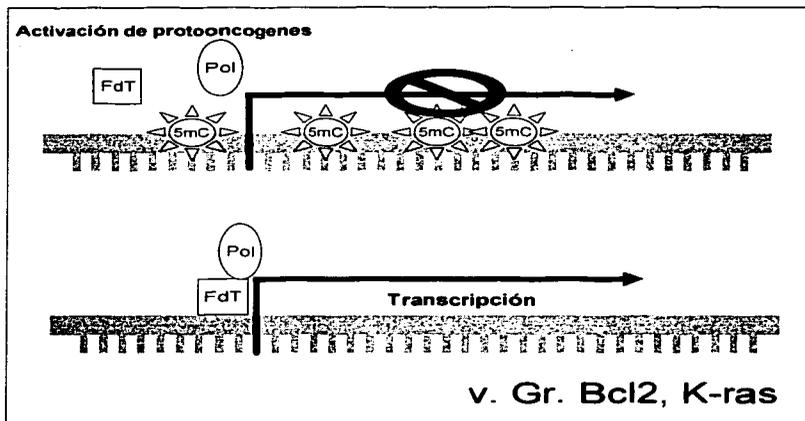


Figura 7. Activación de protooncogenes por desmetilación.

La relación entre inestabilidad cromosómica y la hipometilación genómica en cáncer, se ha propuesto en base a algunos estudios en células ES de ratón que tienen delección homocigoto de la Dnmt1⁸⁵; estas células tienen una tasa incrementada de mutaciones que involucran principalmente delección genómica. Además la inestabilidad cromosómica es un hallazgo de los pacientes con el síndrome ICF, el cuál es un desorden genético en humanos, causado por mutaciones génicas que impiden la expresión de Dnmt3b⁸⁶.

A pesar de que el evento más importante en cuanto a frecuencia en cáncer es la hipometilación, también la hipermetilación de áreas específicas. La hipermetilación puede contribuir a la progresión del cáncer produciendo metilación de genes supresores de tumor (figura 8), además debido a las modificaciones en los patrones de metilación se pueden inducir mutaciones puntuales por la deaminación (figura 9).

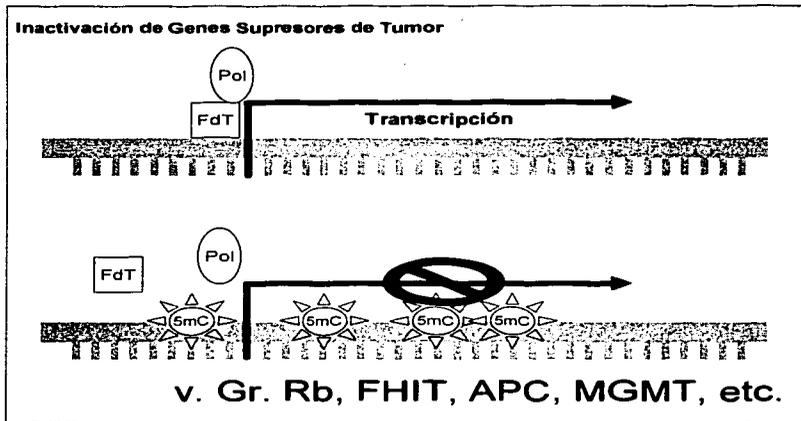


Figura 8. Metilación de genes supresores de tumor

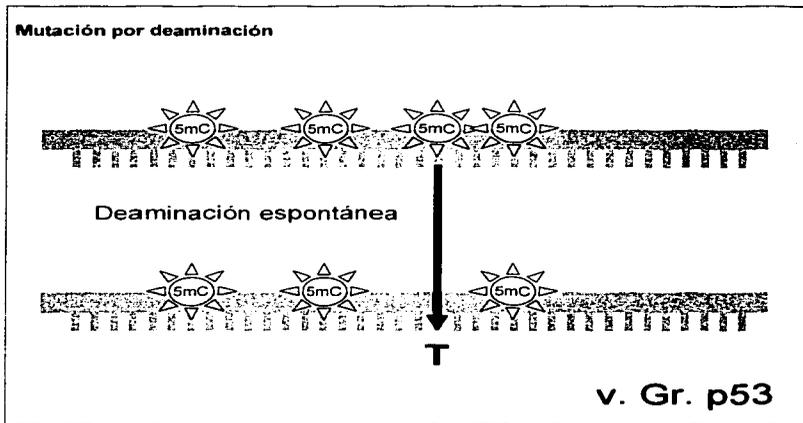


Figura 9. Mutación por deaminación

Las regiones que frecuentemente se hipermetilan, son regiones de las islas CpG que contienen genes constitutivos (house-keeping) y GST. Actualmente está bien

establecido que múltiples genes se encuentran metilados en un líneas celulares⁸⁷. Genes involucrados en: la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, resistencia a drogas, detoxificación, apoptosis, angiogénesis y metástasis; han sido identificados como susceptibles de ser hipermetilados en diferentes cánceres⁸⁸.

Más de la mitad de esos genes causan formas de cáncer familiar cuando se encuentran mutados en germline, y por ende la ventaja de la pérdida de la función de dichos genes es muy clara⁸⁹. Pero muchos de los genes hipermetilados no son GST, y para algunos de estos genes la metilación del promotor es la única forma conocida de inactivación del gen en cánceres, debido a que no se conocen mutaciones⁹⁰.

Desde que la metilación de las islas CpG se ha asociado con inactivación de genes en tumores, la hipermetilación se ha propuesto como un mecanismo alternativo de silenciamiento genético de los alelos de los GST, además del silenciamiento causado por mutación y/o delección génica⁹¹.

Es claro que la hipermetilación es una alteración muy importante en el genoma del cáncer, pero desgraciadamente, el mecanismo responsable de realizar este cambio, actualmente no es bien conocido.

ADN Metiltransferasas y cáncer

Además de los cambios en los patrones de metilación; existen cambios en la expresión de las ADN metiltransferasas, que se encuentran elevadas desde 2.5 a 3.7 veces en tumores de colon⁹² y 4.2 veces en pacientes con leucemia⁹³.

La actividad de la DNMT1 aparentemente se incrementa de manera progresiva a medida que avanza el tumor por sus etapas, en cáncer de colon y pulmón^{94,95}.

Las DNMT3A y DNMT3B muestran un incremento mayor de su transcripción, de 4.4 a 11.7 veces en leucemia mieloide aguda⁹⁶. Así mismo una elevación de la DNMT3B ha sido reportada en tumores sólidos⁹⁷.

El incremento en la expresión de las DNMT's, puede ser funcionalmente importante en cáncer. Un incremento de 2.2 veces la expresión de Dnmt1 produce transformación de fibroblastos NIH3T3.

Además la reducción de la actividad de Dnmt1 en ratones predispuestos al desarrollo de adenomas colónicos, disminuyen la frecuencia de tumores de colon⁹⁸.

Algunos estudios demuestran que miles de islas CpG pudieran estar metiladas en las células tumorales⁹⁹.

Es claro, que tanto en los estudios de metilación global del genoma, Cada tipo de cáncer, puede ser clasificado de acuerdo a su patrón de metilación¹⁰⁰.

Las diferencias de metilación entre los diversos tipos de cánceres, han sido bien caracterizadas, v. gr. En cáncer de próstata GSTP1 se encuentra metilado en más del 95% de los pacientes¹⁰¹, pero en leucemia mieloide aguda permanece desmetilado⁹³. En contraste p15, E-caderina y calcitonina normalmente se encuentra metilados en leucemia mieloide aguda, y rara vez en cáncer de próstata.

El gen de retinoblastoma rara vez se encuentra metilado en leucemia mieloide aguda y en cáncer de próstata; pero muy comúnmente metilado en retinoblastomas¹⁰². Las diferencias específicas en los genes metilados entre los diversos tipos de cánceres, sugieren múltiples hipótesis.

Es importante que las islas CpG que comúnmente se encuentran en la región promotora de los genes house-keeping, permanezcan transcripcionalmente activas durante el desarrollo y la diferenciación; es decir, ya que la metilación de las islas CpG esta asociada con silenciamiento de los genes, es importante que estos genes se encuentran libres de metilación.

Las islas CpG, que son sitios ricos de dinucleótidos CpG, son el blanco de las ADN metiltransferasas, y durante el desarrollo temprano estas islas permanecen desmetiladas, aún cuando el grueso del genoma es sometido a metilación de novo, incluyendo las islas CpG que se encuentran en los genes del cromosoma X o de los alelos inactivados parentalmente (imprinted).

MEDICIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA

Desde el reconocimiento de la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), se han propuesto varios métodos para analizar la presencia de citosinas metiladas en el carbono 5.

Frommer¹⁰³, desarrolló una técnica mediante la cual el ADN genómico es expuesto a bisulfito. En el primer paso de la reacción del bisulfito, las citosinas son sulfonadas y deaminadas, convirtiéndolas en sulfonato de Uracilo. Mientras que una desulfonación subsecuente en un pH básico completa la conversión de las citosinas a uracilos. La C5-metil-citosina no se modifica bajo las condiciones descritas anteriormente. Después del tratamiento con bisulfito, la región del ADN

de interés es amplificada mediante PCR y los productos de PCR son secuenciados. Solo las C5-metil-citosinas son detectadas como citosinas en la secuenciación, mientras que las citosinas no metiladas (convertidas en Uracilo) aparecen como timidinas (figura 10).

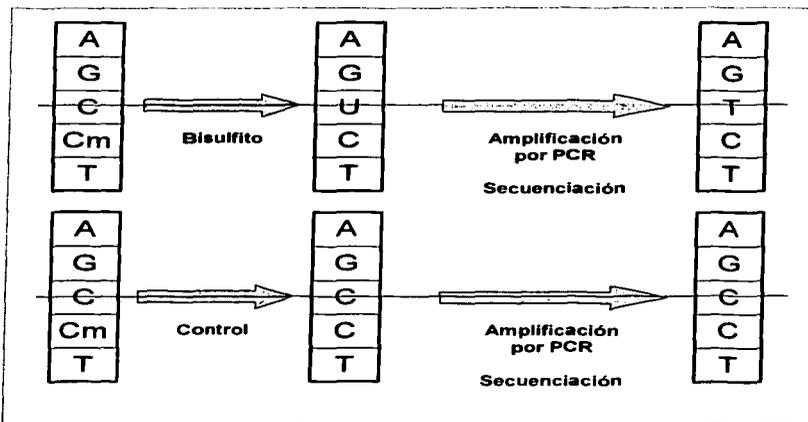


Figura 10. Resultados de la técnica de bisulfito.

OBJETIVOS

1. Determinar la incidencia de genes supresores de tumor metilados en pacientes con cáncer cervicouterino en etapas localmente avanzadas.

- MGMT
- GSTP1
- FHIT
- RAR-B
- APC
- p16
- Receptor de estrógenos
- DAPK
- eCad

MATERIALES Y MÉTODOS

CRITERIOS PARA ENTRAR EL ESTUDIO

Criterios de inclusión

1. Confirmación histológica de cáncer cervicouterino de reciente diagnóstico o confirmación histológica de cáncer cervicouterino recurrente. En cualquier caso los pacientes deberán tener el tumor primario o recurrencia susceptible de biopsia por sacabocado.
2. Edad entre 18 y 70 años
3. Karnofsky mayor de 60%.

Criterios de exclusión

1. Enfermedad no susceptible de biopsiar (con pinza de sacabocado) o en aquellas que se requiera cualquier maniobra invasiva para obtener tejido.
2. Tratamiento concomitante con otra droga.
3. Malignidad previa o concomitante excepto carcinoma de piel no melanoma

Violación de criterios de entrada.

Los criterios deben ser seguidos puntualmente. Si sucediera que un paciente se incluyera de manera inapropiada se discontinuará del estudio.

TAMAÑO DE MUESTRA

Se incluirán 14 pacientes.

APOYO TÉCNICO REQUERIDO.

El Instituto Nacional de Cancerología en donde se llevará a cabo el proyecto cuenta con todos los recursos humanos y materiales necesarios para llevar a cabo esta investigación.

MÉTODOS DE LABORATORIO.

La biopsia será obtenida por el Dr. López Graniel del Departamento de Ginecología. La biopsia será inmediatamente colocada en hielo y procesada para la extracción de ADN: Kit Wizard Genomic Purification.

ANÁLISIS DE METILACIÓN.

Este análisis se llevará a cabo con PCR específica de metilación que brevemente, consiste en la modificación previa del DNA con bisulfito que se llevará a cabo con el de CpG modification Kit Intergen.

El bisulfito convierte las citocinas no metiladas en uracilo y las citocinas metiladas las deja sin modificar. Una vez realizada la modificación del DNA, entonces se lleva a cabo una amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencias metiladas y no metiladas¹⁰⁴ (tabla 11). Los productos serán visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS

El estado de la metilación de nueve regiones promotoras de GST fue determinado en biopsias de cáncer de cérvix.

De los nueve promotores analizados, en ninguno se demostró que no hubiera metilación, mas sin embargo de los catorce pacientes, en uno de ellos se demostró que no tenía ningún GST metilado (paciente 2). En la tabla número 1 se resumen los hallazgos.

Resultados de metilación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Total
MGMT										M			M		14%
GSTP1	M		M	M	M	M		M	M	M	M	M	M	M	86%
FHIT	M		M												14%
RARB			M		M			M	M	M	M				43%
APC				M		M	M		M				M		36%
p16				M		M		M		M		M			36%
RE	M		M		M										21%
DAPK			M	M	M	M					M	M		M	50%
ECAD	M				M					M			M		29%
TOTAL %	44	0	56	44	56	44	11	33	33	56	33	33	44	22	

46 GENES METILADOS DE 126 POSIBLES (37%)

Tabla 1. Hallazgos de metilación

En total encontramos que de los 126 genes analizados solamente 46 (37%) de ellos se encontraban metilados.

DISCUSIÓN

Muchos estudios previos han descrito la importancia de la metilación del ADN en los cánceres humanos ya que la metilación no es un proceso exclusivo de algún tipo de cáncer en particular (v.arriba) y por ejemplo GSTP1 se encuentra metilado en cáncer de la próstata (83%), de mama (31%), y de riñón (20%). Aún cuando se encontraba el promotor desmetilado en cáncer de ovario y de endometrio.

Nuestros resultados son similares a los de Virmani¹⁰⁵, y de Dong¹⁰⁶, particularmente con el estudio de Dong la correlación es muy estrecha. En comparación con la serie de Virmani encontramos en nuestro grupo de pacientes estudiados una gran disparidad en el promotor de GSTP1, por lo que al igual que el resto de paciente es necesario hacer secuenciación y determinar RNA, antes de poder establecer alguna relación clínica.

	p16	RARB	FHIT	GSTP1	MGMT	hMLH1
Virmani	42	26	32	21	26	5
INCAN	36	43	14	86	14	N/A

	DAPK	HIC	APC	P16	eCad	MGMT
Dong	51	45	32	30	28	8
INCAN	50	N/A	36	36	29	14

No hay información publicada sobre los cambios de los patrones de metilación en cáncer cervicouterino, salvo los descritos por Virmani¹⁰⁵, quien encontró diferencias en los patrones de metilación entre NIC, tejido sano y cáncer. Lo que sugiere que la metilación juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis sobre todo en etapas tardías.

CONCLUSIONES

Aún cuando nuestros resultados y conclusiones necesitan extenderse a una serie mas grande. Estos sugieren que la metilación es un fenómeno importante y repetible dentro de los cánceres cervicouterinos, lo que daría pie a tener la metilación como un blanco terapéutico.

REFERENCIAS

- 1 DeVita, Principles of clinical oncology
- 2 Holland, Frei. Cancer Medicine 5th ed. American Cancer Society.
- 3 Bergstrom R, Sparen P, Adami HO. Trends in cancer of the cervix uteri in Sweden following cytological screening. Br J Cancer 1999;81:159-66.
- 4 Zheng T, Holford TR, Ma Z, Chen Y, Liu W, Ward BA, et al. The continuing increase in adenocarcinoma of the uterine cervix: a birth cohort phenomenon. Int J Epidemiol 1996;25:252-8.
- 5 Liu S., Semenciw R., Mao Y.. Cervical cancer: the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. Can. Med. Assoc. J. 2001; 164: 1151-1152.
- 6 Armstrong B, Holman D. Increasing mortality from cancer of the cervix in young Australian women. Med J Aust 1981;9:460-2.
- 7 The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. National Cancer Institute Workshop. JAMA: Journal of the American Medical Association 262(7): 931-934, 1989.
- 8 Kremsdorf D, Jablonska S, Favre M, Orth G. Biochemical characterization of two types of human papillomaviruses associated with epidermodysplasia verruciformis. J Virol 1982; 43(2): 436-47
- 9 Crum CP, Ikenberg H, Richart RM, Gissman L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. N Engl J Med 1984; 310: 880-883
- 10 Munger K. The role of human papillomaviruses in human cancers. Front Biosci 2002; 7: d641-9
- 11 Saranath D, Khan Z, Tandle AT, Dedhia P, Sharma B, Contractor R, Shrivastava S, Dinshaw K. HPV16/18 prevalence in cervical lesions/cancers and p53 genotypes in cervical cancer patients from India. Gynecol Oncol 2002; 86(2):157-62.
- 12 de Villiers E-M. Taxonomic classification of papillomaviruses. Papillomavirus Rep 2001;12:57-63.
- 13 Kjaer SK, van den Brule AJ, Paul G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, Suntum M, Bock JE, Poll PA, Meijer CJ. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. BMJ. 2002; 325(7364): 572
- 14 Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. J Clin Microbiol 1995;33:901-905.
- 15 van den Brule AJ, Pol R, Franssen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, Snijders PJ. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. J Clin Microbiol 2002;40:779-787.
- 16 Davies P, Komegay J, Iftner T. Current methods of testing for human papillomavirus. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2001;15:677-700.
- 17 Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. J Clin Microbiol 1998;36:3020-3027.
- 18 Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80(12): 3812-5
- 19 Muñoz, N., Bosch, F.X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F., Meijer, C.J.L.M., Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. NEJM 348:518-527, 2003.
- 20 Fields, C., Adams, M.D., White, O., Venter, J.C. How many genes in the human genome? Nature Genet.1994; 7, 345-6.
- 21 Antequera, F. & Bird, A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1993; 90, 11995-9.
- 22 Jean-Michel Claverie GENE NUMBER: What If There Are Only 30,000 Human Genes? Science 2001; 291: 1255-7.

- 23 Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissole S, Hunt AR, Collins JE, Bruskiwich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates AL, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP, et al. The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* 1999; 402(6761): 489-95.
- 24 Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, Groner Y, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Schillhabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh J, Schibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonarakis SE, Minoshima S, Shimizu N, Nordtsiek G, Hornischer K, Brant P, Scharfe M, Schon O, Desario A, Reichelt J, Kauer G, Blocker H, Ramser J, Beck A, Klages S, Hennig S, Riesselmann L, Dagand E, Haaf T, Wehrmeyer S, Borzym K, Gardiner K, Nizetic D, Francis F, Lehrach H, Reinhardt R, Yaspo ML; The chromosome 21 mapping and sequencing consortium. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; 405(6784): 311-9.
- 25 Ewing B, Green P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet* 2000; 25(2): 232-4
- 26 Roest Crolius H, Jailton O, Bernot A, Dasilva C, Bouneau L, Fischer C, Fizesame C, Wincker P, Brottier F, Quetier F, Saurin W, Weissenbach J. Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using Tetraodon *nigroviridis* DNA sequence. *Nat Genet* 2000; 25(2): 235-8.
- 27 G Gamba. Initial sequence and analysis of the human genome. *Rev Invest Clin*, Jul 2001; 53(4): 294-7.
- 28 Crick F. Central dogma of molecular biology. *Nature* 1970; 227(258): 561-3.
- 29 Terin HM, and Mizutani S. *Nature* 1970; 226(252):1211-3.
- 30 Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:349-83
- 31 McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 1986; 12: 795-805
- 32 Atchison ML. Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:127-53
- 33 Nirenberg MW, Leder P. RNA codewords and protein synthesis. *Science* 1964. 145: 1399-
- 34 Bestor T.H., Chandler V.L., Feinberg A.P., Epigenetic effects in eukaryotic gene expression. *Dev Genet*, Jan 1994; 15(6): 458-62.
- 35 Bestor T.H., The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.*, Oct 2000; 9: 2395 - 2402.
- 36 Baylin S.B., Herman J.G., Promoter Hypermethylation—Can This Change Alone Ever Designate True Tumor Suppressor Gene Function?. *J Natl Cancer Inst*, May 2001; 93: 664 - 665.
- 37 Jones P.A., Laird P.W., Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, Feb 1999; 21(2): 163-7
- 38 Robertson KD. DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* (2002) 21, 5361 - 5379
- 39 Reik W., Dean W., Walter J., Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science*, Aug 2001; 293: 1089 - 1093
- 40 Li E., Bestor T.H., Jaenisch R., Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, Jun 1992; 69(5): 915-26.
- 41 Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E., DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, Oct 1999; 99(3): 247-57.
- 42 Robertson K.D., Wolffe A.P., DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*, Oct 2000; 1(1): 11-9.
- 43 Robertson K.D., Ait-Si-Ali S., Yokochi T., Wade P.A., Jones P.L., Wolffe A.P., DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, Jul 2000; 25(3): 338-42.
- 44 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG and Baylin SB. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet.*, 21, 103 ± 107.
- 45 Bird A. MOLECULAR BIOLOGY: DNA Methylation de Novo. *Science*, Dec 1999; 286: 2287 - 2288.
- 46 Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V., Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol*, Oct 1988; 203(4): 971-83.

- 47 Bestor T.H., Ingram V.M., Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *PNAS*, Sep 1983; 80(18): 5559-63.
- 48 Bestor T.H., Verdine G.L., DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol*, Jun 1994; 6(3): 380-9.
- 49 Bestor T.H., Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature*, May 1998; 393(6683): 311-2.
- 50 Yen R.W., Vertino P.M., Nelkin B.D., Yu J.J., el-Deiry W., Cumaraswamy A., Lennon G.G., Trask B.J., Baylin S.B., Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* May 1992; 20: 2287 - 2291.
- 51 Bestor T.H., Tycko B., Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet*, Apr 1996; 12(4): 363-7.
- 52 Bestor T.H., DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Jan 1990; 326(1235): 179-87.
- 53 Robertson K.D., DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, May 2001; 20(24): 3139-55.
- 54 Pradhan S., Bacolla A., Wells R.D., Roberts R.J., Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. I. EXPRESSION, PURIFICATION, AND COMPARISON OF DE NOVO AND MAINTENANCE METHYLATION. *J. Biol. Chem*, Nov 1999; 274: 33002 - 33010
- 55 Bacolla A., Pradhan S., Roberts R.J., Wells R.D., Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. II. STEADY-STATE KINETICS REVEAL ALLOSTERIC ACTIVATION BY METHYLATED DNA. *J. Biol. Chem*, Nov 1999; 274: 33011 - 33019.
- 56 J Flynn, JF Glickman, NO Reich. Murine DNA cytosine-C5 methyltransferase: pre-steady- and steady-state kinetic analysis with regulatory DNA sequences. *Biochemistry*, Jun 1996; 35(23): 7308-15.
- 57 JF Glickman, J Flynn, and NO Reich. Purification and characterization of recombinant baculovirus-expressed mouse DNA methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*, Jan 1997; 230(2): 280-4.
- 58 T Yokochi, KD Robertson. Preferential Methylation of Unmethylated DNA by Mammalian de Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a. *J. Biol. Chem*, Mar 2002; 277: 11735 - 11745.
- 59 H Leonhardt, AW Page, HU Weier, TH Bestor. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, Nov 1992; 71(5): 865-73.
- 60 CQ Liu, JF Huang, Y Wang, and WB Liu. Methylation and gene mutation in eukaryotic DNA. *Acta Biol Hung*, Jan 1998; 49(2-4): 185-91
- 61 Gardiner-Garden M, Frommer M., CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, Jul 1987; 196(2): 261-82.
- 62 Antequera F, Bird A., CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol*, Sep 1999; 9(17): R661-7.
- 63 Clark S.J., Melki J., DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?. *Oncogene*, Aug 2002; 21(35): 5380-7.
- 64 Boyes J., Bird A., Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.*, Jan 1992; 11: 327 - 333.
- 65 Yoder J.A., Soman N.S., Verdine G.L., Bestor T.H., DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol*, Jul 1997; 270(3): 385-95.
- 66 Iguchi-Ariga S.M., Schaffner W., CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes & Dev.*, May 1989; 3: 612 - 619.
- 67 Molloy P.L., Watt F., DNA methylation and specific protein-DNA interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, Jan 1990; 326(1235): 267-75.
- 68 Bird A.P., Wolffe A.P., Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, Nov 1999; 99(5): 451-4.
- 69 Nan X., Cross S., Bird A., Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. *Novartis Found Symp*, Jan 1998; 214: 6-16; discussion 16-21, 46-50.
- 70 SB Baylin, JG Herman, JR Graff, PM Vertino, JP Issa. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*, Jan 1998; 72: 141-96.

- 71 A Narayan, W Ji, XY Zhang, A Marrogi, JR Graff, SB Baylin, M Ehrlich. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. *Int J Cancer*, Sep 1998; 77(6): 833-8.
- 72 PA Jones. DNA methylation in development of bladder cancer. *Adv Exp Med Biol*, Jan 1999; 462: 419-23.
- 73 IP Pogribny, L Muskhelishvili, BJ Miller, SJ James. Presence and consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl-deficient rats. *Carcinogenesis*, Nov 1997; 18: 2071 - 2076.
- 74 SJ James, BJ Miller, AG Basnakian, IP Pogribny, M Pogribna, L Muskhelishvili. Apoptosis and proliferation under conditions of deoxynucleotide pool imbalance in liver of folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis*, Feb 1997; 18: 287 - 293.
- 75 LL Stern, JB Mason, J Selhub, SW Choi. Genomic DNA Hypomethylation, a Characteristic of Most Cancers, Is Present in Peripheral Leukocytes of Individuals Who Are Homozygous for the C677T Polymorphism in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, Aug 2000; 9: 849 - 853.
- 76 YI Kim, IP Pogribny, AG Basnakian, JW Miller, J Selhub, SJ James, JB Mason. Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. *Am. J. Clinical Nutrition*, Jan 1997; 65: 46 - 52.
- 77 AP Feinberg, B Vogelstein. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, Jan 1983; 301(5895): 89-92.
- 78 AP Feinberg, B Vogelstein. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, Feb 1983; 111(1): 47-54.
- 79 R Holliday, T Ho. Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation. *PNAS*, Jul 1998; 95: 8727 - 8732.
- 80 TH Bestor, B Tycko. Creation of genomic methylation patterns. *Nat Genet*, Apr 1996; 12(4): 363-7.
- 81 Narayan, C Tuck-Muller, K Weissbecker, D Smeets, M Ehrlich. Hypersensitivity to radiation-induced non-apoptotic and apoptotic death in cell lines from patients with the ICF chromosome instability syndrome. *Mutat Res*, Nov 2000; 456(1-2): 1-15.
- 82 CM Tuck-Muller, A Narayan, F Tsieng, DF Smeets, J Sawyer, ES Fiala, OS Sohn, M Ehrlich. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. *Cytogenet Cell Genet*, Jan 2000; 89(1-2): 121-8.
- 83 J Vachtenheim, I Horakova, H Novotna. Hypomethylation of CCGG sites in the 3' region of H-ras protooncogene is frequent and is associated with H-ras allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, Mar 1994; 54: 1145 - 1148.
- 84 C De Smet, C Lurquin, B Lethé, V Martelange, T Boon. DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. *Mol. Cell. Biol.*, Nov 1999; 19: 7327 - 7335.
- 85 RZ Chen, U Pettersson, C Beard, L Jackson-Grusby, R Jaenisch. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, Sep 1998; 395(6697): 89-93.
- 86 D Bourchis, GL Xu, CS Lin, B Bollman, TH Bestor. Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, Dec 2001; 294: 2536 - 2539.
- 87 JR Melki, PC Vincent, SJ Clark. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.*, Aug 1999; 59(15): 3730-40.
- 88 JF Costello, C Plass. Methylation matters. *J. Med. Genet.*, May 2001; 38: 285 - 303
- 89 SB Baylin, SA Belinsky, JG Herman. Aberrant Methylation of Gene Promoters in Cancer—Concepts, Misconcepts, and Promise. *J Natl Cancer Inst*, Sep 2000; 92: 1460 - 1461.
- 90 SB Baylin, JG Herman. Promoter Hypermethylation—Can This Change Alone Ever Designate True Tumor Suppressor Gene Function?. *J Natl Cancer Inst*, May 2001; 93: 664 - 665.
- 91 PA Jones, PV Laird. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, Feb 1999; 21(2): 163-7.
- 92 C Schmutte, AS Yang, TT Nguyen, RW Beart, PA Jones. Mechanisms for the involvement of DNA methylation in colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, May 1996; 56: 2375 - 2381.
- 93 JR Melki, P Warnecke, PC Vincent, SJ Clark. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia*, Mar 1998; 12(3): 311-6.
- 94 JP Issa, SB Baylin, SA Belinsky. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res.*, Aug 1996; 56: 3655 - 3658

- 95 SA Belinsky, KJ Nikula, SB Baylin, JPJ Issa. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer. *PNAS*. Apr 1996; 93: 4045 - 4050.
- 96 S Mizuno, T Chijiwa, T Okamura, K Akashi, Y Fukumaki, Y Niho, H Sasaki. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001 Mar 1;97(5):1172-9
- 97 KD Robertson, E Uzvolgyi, G Liang, C Talmadge, J Sumegi, FA Gonzales, PA Jones. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.*, Jun 1999; 27(11): 2291-8.
- 98 PW Laird, L Jackson-Grusby, A Fazell, SL Dickinson, WE Jung, E Li, RA Weinberg, R Jaenisch. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*. Apr 1995; 81(2): 197-205.
- 99 JF Costello, MC Fr?hwald, DJ Smiraglia, LJ Rush, GP Robertson, X Gao, FA Wright, JD Feramisco, P Pelton?ki, JC Lang, DE Schuller, L Yu, CD Bloomfield, MA Caligiuri, A Yates, R Nishikawa, H Su Huang, NJ Petrelli, X Zhang, MS O'Dorisio, WA Held, WK Cavenee, and C Plass. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. Feb 2000; 24(2): 132-8.
- 100 RS Gitan, H Shi, CM Chen, PS Yan, TH Huang. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis. *Genome Res* 2002 Jan;12(1):158-64
- 101 DS Millar, KK Ow, CL Paul, PJ Russell, PL Molloy, and SJ Clark. Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*. Feb 1999; 18(6): 1313-24.
- 102 C Stirzaker, DS Millar, CL Paul, PM Warnecke, J Harrison, PC Vincent, M Frommer, and SJ Clark. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.*, Jun 1997; 57: 2229 - 2237
- 103 M Frommer, LE Mcdonald, DS Millar, CM Collis, F Watt, GW Grigg, PL Molloy, CL Paul. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.89, 1827-1831
- 104 Herman, J. G., Graff, J. R., Mychanen, S., Nelkin, B. D., Baylin, S. B. Methylation-specific PCR a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9821-9826, 1996.
- 105 AK Virmani, C Muller, A Rathi, S Zochbauer-Mueller, M Mathis, AF Gazdar. Aberrant Methylation during Cervical Carcinogenesis. *Clin Can Res* 7, 584-589, March 2001
- 106 SM Dong, HS Kim, SH Rha, D Sidransky. Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Carcinoma of the Uterine Cervix. *Clinical Cancer Research* 2001 7, 1982-1986.