



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PERFIL DE METILACIÓN GLOBAL EN PACIENTES CON CANCER CERVICAL
LOCALMENTE AVANZADO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARCELA ANGÉLICA DE LA FUENTE HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de septiembre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **DE LA FUENTE HERNÁNDEZ MARCELA ANGÉLICA**, con número de cuenta 302032479, con la tesis titulada **"PERFIL DE METILACIÓN GLOBAL EN PACIENTES CON CÁNCER CERVICAL LOCALMENTE AVANZADO."**, realizada bajo la dirección del **DR.: CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA:**

Presidente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Vocal: DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
Secretario: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Suplente: DR. CARLO CÉSAR CORTÉS GONZÁLEZ
Suplente: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de octubre de 2014.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Biológicas por otorgarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría a través de sus programas, tutores, profesores, personal administrativo e instalaciones.

Al apoyo económico recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo comprendido entre enero de 2012 a enero de 2014 y al de los proyectos: SALUD-2009-01-113948 y SALUD-2010-01-141907.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia, la Dra. Leticia Moreno Fierros y la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera por su tutoría, tiempo, comentarios y valiosas aportaciones que ayudaron a la elaboración de esta tesis y a mi crecimiento como estudiante.

A los miembros del jurado la Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera, la Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas, el Dr. Alejandro García Carrancá, el Dr. Carlo Cesar Cortés González y el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo por su tiempo en la revisión y observaciones realizadas a este escrito.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Siempre que se concluye algún trabajo o etapa en la vida, es necesario voltear y reconocer que su realización fue posible gracias al esfuerzo conjunto de una cantidad de personas con las que se convive durante el trayecto y que en ocasiones desconocen lo mucho que pudieron participar directamente o indirectamente. De mi parte solo queda reconocer, agradecer y valorar todo aquello que recibí de cada uno.

Agradezco nuevamente al Dr. Carlos Pérez Plasencia por la oportunidad de formar parte de su equipo y por la confianza depositada para la realización de este proyecto. Gracias por transmitir su conocimiento y contribuir en mi formación.

A la Dra. Rosa María Alvarado por su gran amistad y ejemplo durante este trayecto. Desde un inicio trabajé contigo y nunca dudaste en enseñarme, orientarme y escucharme. Valoro infinitamente tu amistad Rose, eres como mi hermana mayor de la ciencia. Te estimo muchísimo.

A la Dra. Verónica Fragoso, al M. en C. Jorge Retana y al Dr. Eduardo López por estar siempre dispuestos a apoyarme, ayudarme y colaborar como un equipo. Gracias por su amistad y sobre todo su gran calidez humana.

Al Dr. César Cortés, por su gran apoyo e interés en mi formación. Gracias por compartir sus conocimientos y brindarme su amistad.

Al matemático Federico Lasa Gonsebatt quien realizó parte del análisis de este trabajo. He aquí un ejemplo de que siempre hay que saber trabajar en equipo para enriquecer el conocimiento y reconocer que las limitaciones de una persona son las cualidades de otra. Muchas gracias también por tu amistad.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Oncogenómica del INcan, los que estuvieron al inicio, durante o llegaron después, pero que de igual forma son testigos de nuestro crecimiento en conjunto. Quien más si no ustedes con los que conviví día a día, comida, tardes, noches, fines de semana y en ocasiones madrugadas mientras trabajábamos. Los recuerdo con gran cariño Montse, Itzel, Gaby, Nadia, Cinthya, Liz, Mary, Mau, Osman, Vic, Abraham, Pedro, y Arturo.

Al Dr. Daniel Espinosa y el Dr. Jesús Argueta por sus aportaciones, su trabajo, por todas las tardes y las charlas que tuvimos. Ambos son para mí un ejemplo. Sigán trabajando de esa forma tan comprometida e incansablemente enamorada de la ciencia.

A mis amigos Félix y Rodolfo por todo su apoyo y porras.

Y por último y no menos importantes a Angélica, Blanca, Itzel, Maritza, Mayra y Ricardo. Gracias por su compañía y amistad a lo largo de mi vida. Sin duda son parte de este proyecto concluido. Los quiero infinitamente.

DEDICATORIAS

Dedico mi esfuerzo y trabajo a Dios. Gracias por tu amor incondicional, tu compañía, por ponerme retos que me ayudan a crecer y rodearme de personas valiosas que me acompañan día a día. Este trabajo es tuyo.

También dedico y agradezco a toda mi familia en especial a mi mamá Carmen y mis hermanos José, Vero y Mayra, por estar conmigo, escucharme, ayudarme, comprenderme, apoyarme y quererme incondicionalmente; a Bulé y Naty por dar tanta alegría a mi vida; y a mi abuelita Carlotita por ser simplemente ella, la mujer que más admiro en el mundo. Ustedes son mi motivación e impulso día a día. ¡¡Los amo!!

A mis hermanos y amigos de la Fundación *Iluminando con Amor*, principalmente a Gonzalo, Lupita, Martín y Niko, por darme la oportunidad de complementar mi vida a su lado y ayudarme a intentar ser una mejor persona.

A Mike, porque en la recta final “apareciste” y me echaste porras como nadie. Gracias por creer, confiar en mí y robarme tantas sonrisas.

A Ignacia, Guadalupe, Esperanza, Lorena, Ángela, Demetria, Concepción,
Verónica, Roció, Irma, Elsa, Lucía, Antonia, Angélica, Luz, Daniela,
Jazmín, Berenice, Isela, Florencia, Lerma, Angélica
y a todas las mujeres en lucha contra esta enfermedad.

Índice de Contenido

Índice de Contenido.....	1
Índice de Tablas	3
Índice de Figuras	4
Abreviaturas	7
Resumen en español.....	8
Resumen en inglés.....	10
Introducción.....	11
Cáncer cervical.....	11
Incidencia y mortalidad	11
Morfología del útero y cérvix	13
Detección y diagnóstico	14
Clasificación.....	15
Tratamiento.....	17
El papel del virus del papiloma humano en el cáncer cervical	18
Características generales del VPH	18
Región larga de control.....	18
Proteínas estructurales	19
Proteínas funcionales	19
Oncoproteínas	20
Ciclo viral e infecciones persistentes	23
Cáncer.....	25
Alteraciones epigenéticas en el desarrollo del cáncer	26
Metilación del ADN.....	26
ADN metiltransferasas.....	27
Islas CpG.....	28
Metilación del ADN en células normales.....	28

Metilación del ADN y cáncer	29
Antecedentes	31
Objetivos.....	41
Hipótesis.....	42
Metodología.....	43
Diseño y alineación de adaptadores específicos.....	45
Obtención de la fracción metilada y fracción no metilada	45
Marcaje diferencial de las fracciones con fluorocromos e hibridación sobre microarreglos.....	50
Escaneo del arreglo y obtención de los datos	51
Análisis de datos de microarreglos.....	52
Análisis utilizando la herramienta Microsoft Office Access	52
Análisis utilizando el lenguaje de programación R.....	53
Validación de resultados por MSP	54
Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación por MSP	55
Modificación con bisulfito de sodio.....	55
Análisis de metilación por MSP.....	56
Resultados	59
Discusión	95
Conclusiones	105
Perspectivas	107
Bibliografía	108

Índice de Tablas

Tabla 1. Estadificación FIGO para el carcinoma cervical	16
Tabla 2. Frecuencia de metilación de distintos genes en cáncer cervical	38
Tabla 3. Biomarcadores reportados en la literatura basados en la hipermetilación del ADN en relación con la respuesta a la terapia	43
Tabla 4. Características clínico patológicas de las pacientes y muestras consideradas en el estudio.....	47
Tabla 5. Registro de hibridación de muestras	51
Tabla 6. Condiciones de la PCR para el análisis de metilación por MSP	57
Tabla 7. Caracterización de las muestras incluidas en este estudio y tipo de respuesta posterior al tratamiento.	59
Tabla 8. Marcaje diferencial con fluorocromos de la Fracción Metilada- Cy3 y Fracción No Metilada-Cy5.	64
Tabla 9. Genes con promotores hipermetilados en todas las muestras del grupo EP ..	70
Tabla 10. Características de la región promotora del gen MFSD6	73
Tabla 11. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de MFSD6 por MSP	74
Tabla 12. Características de la región promotora del gen PAPSS2	75
Tabla 13. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de PAPSS2 por MSP	76
Tabla 14. Características de la región promotora del gen ZCCHC13.....	77
Tabla 15. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de ZCCHC13 por MSP	78
Tabla 16. Número de genes que presentan una metilación diferencial significativa en el grupo tumoral en comparación con el normal.....	86
Tabla 17. Número de genes que presentan una metilación diferencialmente significativa en el grupo EP con respecto al grupo RC.....	91

Índice de Figuras

Figura 1. Estimación de la incidencia mundial del cáncer cervical en el año 2012.....	11
Figura 2. Estimación de mortalidad mundial del cáncer cervical en el año 2012.....	12
Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres mexicanas.	13
Figura 4. Órganos sexuales internos femeninos	14
Figura 5. Métodos de detección de infección por VPH.....	15
Figura 6. Organización del genoma del VPH.....	19
Figura 7. Actividad cooperativa de las oncoproteínas en la carcinogénesis cervical.....	21
Figura 8. Participación de la oncoproteína E7 en la transformación celular.....	22
Figura 9. Participación de la oncoproteína E6 en la transformación celular	23
Figura 10. Ciclo viral del VPH.....	24
Figura 11. Características distintivas de las células neoplásicas	25
Figura 12. Participación de las ADN metiltransferasas (DNMTs) en la metilación del ADN.....	27
Figura 13. Metilación del ADN en células normales y tumorales.....	29
Figura 14. Frecuencia de metilación de la región promotora de 15 genes reportados en diversos estudios.....	37
Figura 15. Alineamiento de adaptadores.....	45
Figura 16. Digestión enzimática del ADN genómico y ligación con adaptadores “Lib1-Linker”	46
Figura 17. Metodología general de digestión, amplificación y marcaje	48
Figura 18. Controles de digestión.....	49
Figura 19. Diseño del microarreglo Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array3.....	50
Figura 20. Modificación del ADN por bisulfito de sodio.	56
Figura 21. Metodología para el análisis de metilación por MSP	58
Figura 22. Alineación de los oligos Lib1 y ddMes11 para la síntesis de los adaptadores específicos “Lib1-Linker”	60

Figura 23. Digestión de ADN genómico y ligación con los adaptadores específicos “Lib1-Linker”	61
Figura 24. Amplificación de la fracción genómica metilada y no metilada en comparación con los controles de digestión	63
Figura 25. Hibridación sobre sondas de microarreglos	65
Figura 26. Perfil de metilación en la región promotora de ATM, BRCA1, MLX, TERT, MCM5 y RABL5 en muestras tumorales.	67
Figura 27 Metodología de análisis de los datos de hipermetilación de muestras tumorales empleando microsoft office access	69
Figura 28. Región promotora del gen MFSD6	73
Figura 29. Región promotora del gen PAPSS2	75
Figura 30. Región promotora del gen ZCCHC13.....	77
Figura 31. Análisis de metilación de la región promotora de los genes MFSD6, PAPSS2 y ZCCHC13 por la metodología MSP	79
Figura 32. Perfiles de metilación de las muestras obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen MFSD6	80
Figura 33. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para a región promotora del gen MFSD6	81
Figura 34. Perfiles de metilación de las muestras obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen PAPSS2	82
Figura 35. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para a región promotora del gen PAPSS2	83
Figura 36. Perfiles de metilación de las muestras obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen ZCCHC13	84
Figura 37. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para a región promotora del gen ZCCHC13.....	85
Figura 38. Número de genes diferencialmente metilados en el grupo tumoral con respecto al grupo normal	86

Figura 39. Mapa de Calor con los genes diferencialmente metilados en el grupo Tumoral comparado con el grupo Normal	87
Figura 40. Grafica de volcán con los genes diferencialmente metilados en el grupo Tumoral comparado con el Normal.....	88
Figura 41. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipermetilados en muestras tumorales.....	89
Figura 42. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipometilados en muestras Tumoral	90
Figura 43. Número de genes diferencialmente metilados en el grupo EP con respecto a RC.....	91
Figura 44. Mapa de Calor con los genes diferencialmente metilados en el grupo EP comparado con el grupo RC	92
Figura 45. Gráfica de volcán con los genes diferencialmente metilados en el grupo EP comparado con el grupo RC.	93
Figura 46. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipermetilados en muestras del grupo EP	94
Figura 47. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipometilados en muestras del grupo EP	95

ABREVIATURAS

≥	Mayor o igual
°C	grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
c.b.p.	cuanto baste para
c/u	cada uno
DMR's	Regiones diferencialmente metiladas
dNTP's	dinucleótidos trifosfatos
EC	estadio clínico
EP	enfermedad progresiva
FM	fragmentos de DNA metilados
FNM	fragmentos de DNA no metilados
Gy	Gray
kD	kiloDaltons
mb	megabases
MeDIP	Inmunoprecipitación de ADN metilado
min	minutos
MSP	metilación específica por PCR
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pmol	picomoles
RC	respuesta completa
s	segundos
t	tiempo
T	temperatura
U	Unidades
v. f.	volumen final
VPH	virus del papiloma humano

Actualmente se entiende que los cambios epigenéticos son el resultado de múltiples mecanismos que interactúan para establecer colectivamente estados alternos de la estructura de la cromatina. Uno de los cambios más característicos es la hipermetilación de Islas CpG relacionada con el silenciamiento transcripcional; por otra parte, la hipometilación del ADN contribuye al desarrollo del cáncer generando inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones y pérdida de la impronta genómica favoreciendo así la recombinación mitótica, llevando a deleciones y traslocaciones o promoviendo reordenamientos cromosómicos.

Estudios recientes, han demostrado que los cambios epigenéticos pueden jugar un papel en el desarrollo del cáncer cervical: la evidencia sugiere que la metilación aberrante del ADN está involucrada en etapas precancerosas que pueden progresar rápidamente y generar displasias. Los cambios epigenéticos en las células neoplásicas no sólo proporcionan blancos para la terapia con fármacos, también ofrecen posibilidades únicas para diagnóstico del cáncer en etapas tempranas, pronóstico de la enfermedad, respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad, más aún cuando la tasa de supervivencia no ha mejorado con el tratamiento actual.

Bajo esta evidente necesidad, en este estudio utilizando microarreglos de ADN se comparó la metilación de un grupo de muestras tumorales de pacientes con cáncer cervical localmente avanzado contra muestras de epitelio de cérvix libres de displasia.

Se realizaron dos análisis de los datos; el primero de ellos arrojó 397 genes cuyos promotores están hipermetilados en el 80% y 37 en el 100% de las muestras tumorales pertenecientes a un subgrupo con mal pronóstico. En el segundo análisis de los datos de metilación, primero se comparó el perfil de metilación de las muestras del grupo tumoral contra las del grupo normal, encontrándose 5930 genes cuyas regiones promotoras se encuentran diferencialmente metiladas ($p \leq 0.005$). Entre la hipermetilación de promotores de genes previamente reportados que participan en la carcinogénesis cervical encontramos a TIMP3, RASSF2, RASSF7 WNT9A PAX8 Y TERT. También se analizó el perfil de metilación de las muestras tumorales con distinta

respuesta al tratamiento donde se observó una ganancia en la metilación en el grupo de peor pronóstico al presentar 273 regiones promotoras hipermetiladas y 23 hipometiladas significativamente ($p \leq 0.005$) no estando previamente reportados en la literatura.

De manera general, los análisis permitieron reconocer la desregulación en la metilación, encontrando una hipometilación global y la hipermetilación local del genoma de células neoplásicas mostrándose una mayor hipermetilación en las muestras con peor pronóstico.

Finalmente, se logró validar los resultados obtenidos por los microarreglos con una segunda metodología (MSP) existiendo una concordancia en la metilación dando confiabilidad a nuestros resultados.

ABSTRACT

Epigenetic changes are the result of several mechanisms that interact to establish alternate states of the chromatin structures. One of the most representative changes is the hypermethylation of CpG Island, associated with the inactivation of gene expression. On the other hand, DNA hypomethylation contributes to cancer growth, causing chromosomal instability, reactivation of transposable DNA and losing of the imprinting, which leads to mitotic recombination and to deletions and translocations, or to chromosomal rearrangement.

Recent studies have shown that epigenetic changes may have an important role in the development of cervical cancer. Evidence suggests that aberrant DNA methylation is directly involved in pre-cancerous stages that can rapidly progress, causing dysplasia. Epigenetic changes in neoplastic cells provide not only therapy targets, but also offer unique possibilities for early stage cancer diagnose, for response to the treatment and for disease prognosis and progression, even though the survival rate has not improved with current treatments.

In our paper, by using methylation microarrays, the methylation profile of a group of tumoral samples was compared with dysplasia-free cervix epithelium samples. This comparison allowed us to identify the methylation deregulation, resulting in both a global hypomethylation and a local hypermethylation of the neoplastic cells genome. Our data shown genes previously reported by the scientific literature, whose promoters are hypermethylated, such as genes TIMP3, RASSF2, RASSF7, WNT9A, PAX8 and TERT, all of which are involved in carcinogenic processes.

By comparing the methylation profile of tumoral samples that shown a different response to the conventional treatment, we observed a gain in the local hypermethylation in the cluster with poor prognosis, where we can find genes that so far have not been reported in the scientific literature.

1. CÁNCER CERVICAL

1.1 Incidencia y mortalidad

El cáncer cervical (CC) o cáncer cérvico uterino es el tercer tipo de cáncer más común en mujeres de todo el mundo tan solo antecedido por el cáncer de mama y el cáncer de colon¹. Para el año 2012 se reportaron 528 000 nuevos casos (Figura 1), de los cuales, la mayoría ocurrió en países en vías de desarrollo, donde la alta tasa de incidencia y mortalidad (alrededor del 85%) hace que esta enfermedad sea considerada un problema de salud pública.²

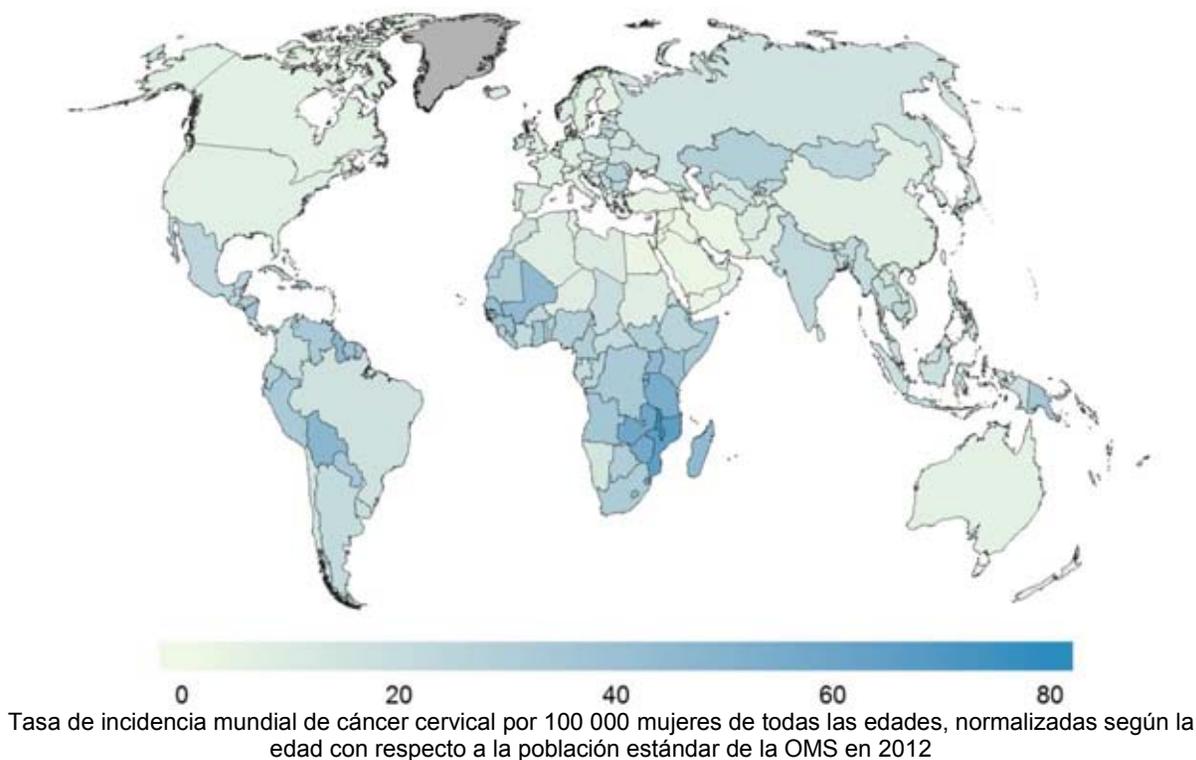
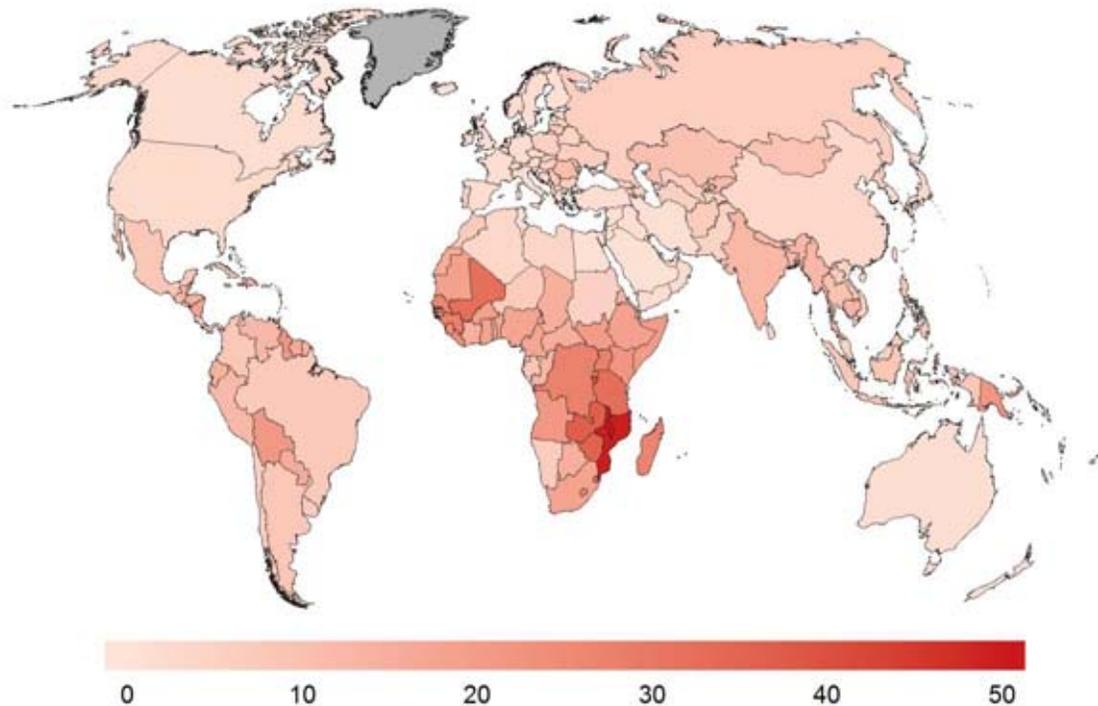


Figura 1. Estimación de la incidencia mundial del cáncer cervical en el año 2012. Globocan 2012, International agency for research on cancer.²

Para el año 2012 se obtuvo un estimado de 266.000 muertes por cáncer cervical en todo el mundo (Figura 2), representando el 7.5% de todas las muertes por cáncer en mujeres. Casi nueve de cada diez (87%) muertes se produjeron en las regiones menos desarrolladas.²



Tasa de incidencia mundial de cáncer cervical por 100 000 mujeres de todas las edades, normalizadas según la edad con respecto a la población estándar de la OMS en 2012

Figura 2. Estimación de mortalidad mundial del cáncer cervical en el año 2012. Globocan 2012, agencia internacional para la investigación sobre el cáncer.²

En México, esta neoplasia ocupa el segundo lugar tanto de incidencia como mortalidad en mujeres registrándose para este mismo año 13960 y 4769 casos respectivamente³ (Figura 3).

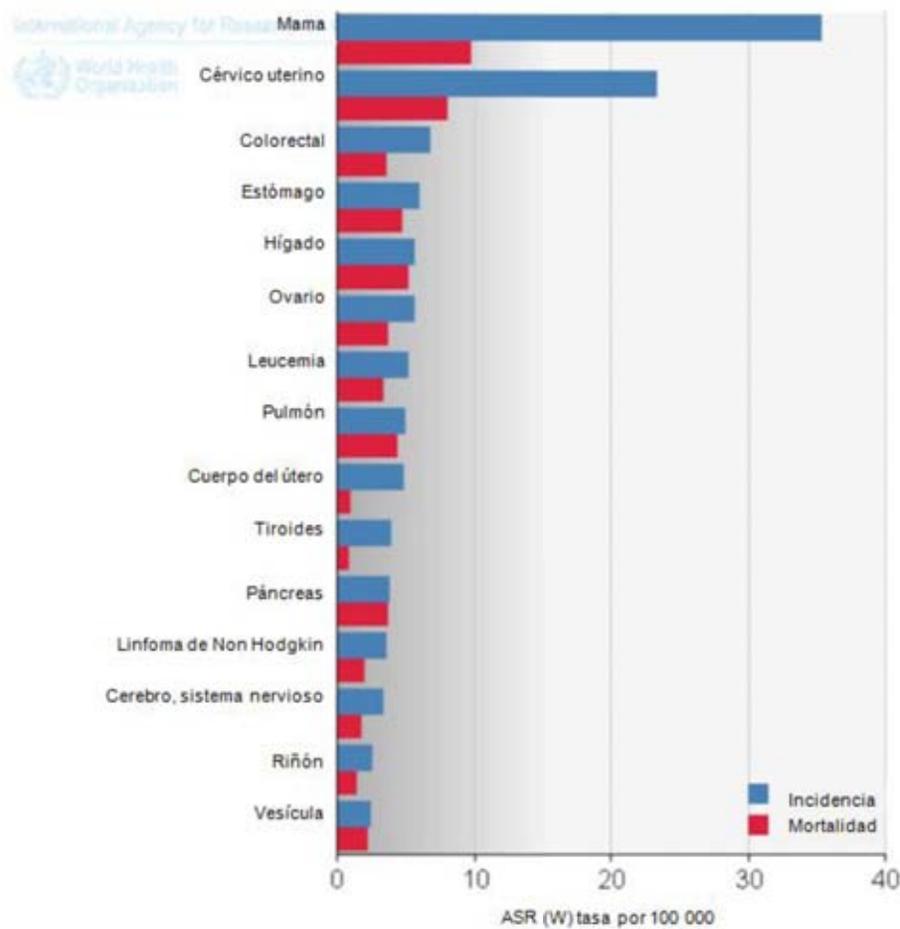


Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer en mujeres mexicanas. Incidencia estandarizada por edad estimada. En barras azules la tasa de incidencia de cáncer en mujeres mexicanas, en barras rojas la tasa de mortalidad en mujeres mexicanas.³

1.2 Morfología del útero y cérvix

El CC se origina en el área que corresponde al cuello uterino y cérvix. El cuello uterino es el segmento inferior estrecho del útero. Está localizado en la parte superior de la vagina y mide aproximadamente 3cm de largo y 2.5cm de diámetro. La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérvix. La parte próxima a la vagina, es el ectocérvix. Los dos tipos principales de células que cubren el cuello del útero son las células escamosas en el ectocérvix y las células glandulares en el endocérvix (Figura 4). El punto en el que estos dos tipos de células se encuentran se denomina zona de transformación.

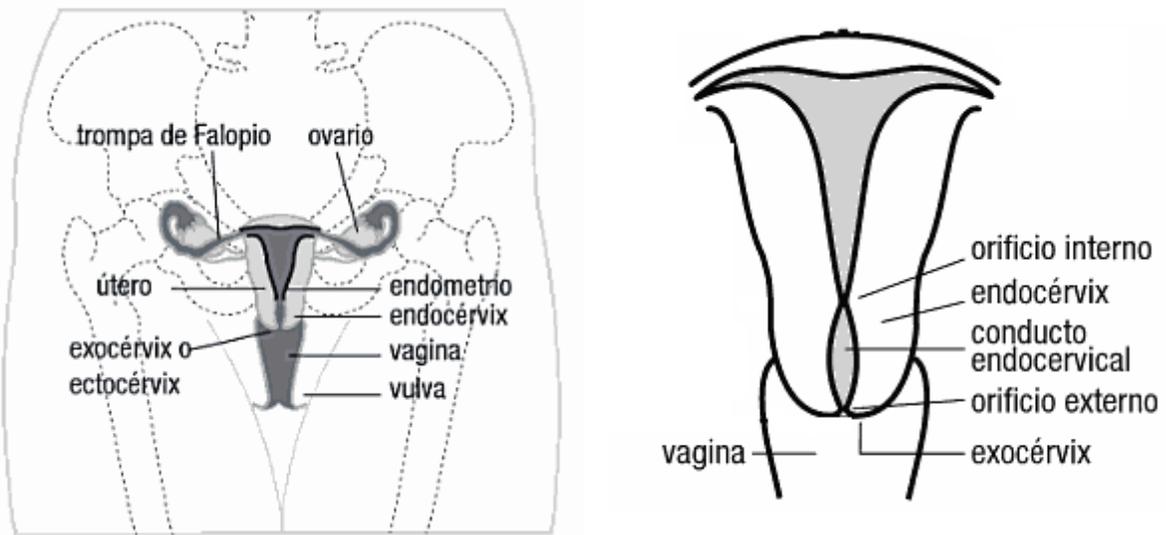


Figura 4. Órganos sexuales internos femeninos. Vista frontal de órganos sexuales internos femeninos, tomada y modificada de Alameda F. et al.⁴

La mayoría de los tumores cervicales se originan en la zona de transformación. El 90% de ellos surgen en el epitelio escamoso metaplásico de la zona de transformación; el otro 10% son adenocarcinomas derivados del epitelio de endocervix.⁴

1.3 Detección y diagnóstico

Los métodos principales para el diagnóstico de esta neoplasia son estudios citológicos como el Papanicolaou o histopatológicos mediante biopsias dirigidas como colposcopia. El Papanicolaou es una prueba de detección que consiste en evaluar cambios citológicos en las células de la zona de transformación. Si la prueba de Papanicolaou muestra células anormales, se recomienda realizar una colposcopia⁵ (Figura 5).

La colposcopia es un procedimiento que permite al médico, a través del colposcopio, observar a detalle regiones anormales del cuello uterino a través de la vagina (Figura 5). Recientemente se han introducido los métodos moleculares para detectar VPH en muestras clínicas.⁶

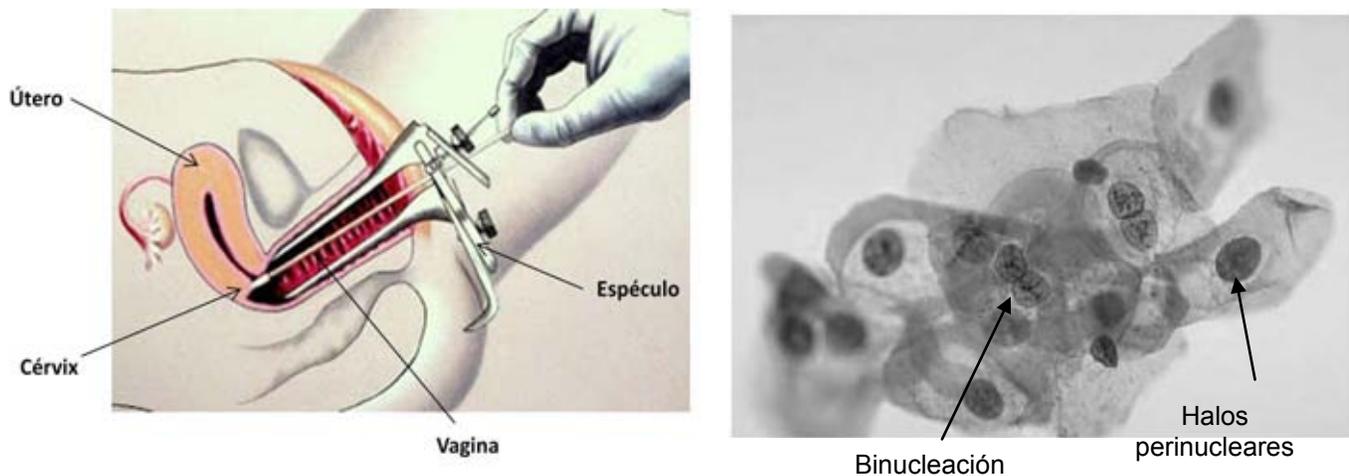


Figura 5. Métodos de detección de infección por VPH. A la izquierda se observa el diagrama que representa la toma de muestra de epitelio cervical para la prueba de Papanicolaou; a la derecha se muestra la imagen de un frotis con infección por el VPH. Se destaca la presencia de halos perinucleares y la binucleación. Tomada y modificada.^{5, 6}

Contrario a lo que sucede en Estados Unidos y Europa, donde hasta el 75% de las ocasiones se diagnostica el cáncer cérvico uterino en estadios clínicos tempranos, en México, las etapas localmente avanzadas (IIB - IVa) (Ib2 - IIa2 – IVa) son las que tienen mayor prevalencia al igual que en otros países en vías de desarrollo.^{7, 8}

1.4 Clasificación

La estadificación más aceptada se basa en resultados de exámenes clínicos, histopatológicos y pruebas citológicas, utilizando la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) del año 2009.⁹

En este sistema, las etapas se expresan con números romanos del 0 al IV. Mientras más pequeño es el número, menor es la propagación del cáncer y un número más alto, representa los estados más avanzados. Todas las etapas, excepto la etapa 0, se subdividen en grupos que se identifican con letras y números como a continuación se describen¹⁰ (Tabla 1):

Tabla 1. Estadificación FIGO para el carcinoma cervical¹¹

Estadio I	Carcinoma limitado al cérvix
IA	Carcinoma infiltrante diagnosticado con el microscopio.
IA1	Infiltración del estroma ≤ 3 mm en profundidad; extensión en superficie ≤ 7 mm.
IA2	Infiltración del estroma >3 mm pero ≤ 5 mm en profundidad con extensión en superficie ≤ 7 mm.
IB	Lesión visible clínicamente limitada al cérvix o carcinoma microscópico de mayor dimensión que lo indicado en el estadio IA2.
IB1	Lesión visible clínicamente ≤ 4 cm en su diámetro máximo.
IB2	Lesión visible clínicamente > 4 cm en su diámetro máximo.
Estadio II	El tumor se extiende más allá del útero sin afectar la pared pélvica o al tercio inferior de la vagina.
IIA	No hay invasión de los parametrios.
IIA1	Lesión visible clínicamente ≤ 4 cm en su diámetro máximo.
IIA2	Lesión visible clínicamente > 4 cm en su diámetro máximo.
IIB	Hay invasión de los parametrios.
Estadio III	El tumor se extiende a la pared pélvica, afecta al tercio inferior de la vagina, causa hidronefrosis o anulación de la función renal.
IIIA	El tumor afecta al tercio inferior de la vagina sin extensión a la pared pélvica.
IIIB	El tumor se extiende a la pared pélvica, causa hidronefrosis o anulación de la función renal.
Estadio IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis comprobado por biopsia de la mucosa vesical o rectal.
IVA	El tumor infiltra la mucosa de la vejiga o del recto o se extiende más allá de la pelvis.
IVB	Metástasis a distancia.

1.5 Tratamiento

La detección temprana y el tratamiento oportuno de lesiones precancerosas pueden prevenir la progresión a cáncer.

Para pacientes en Estadio Clínico (EC) IA1 los tratamientos varían desde la conización cervical hasta la histerectomía tipo I. Como resultado se obtiene un restablecimiento del 99 al 100% de las pacientes.⁷

En EC IA2 a IB se realiza histerectomía radical tipo III donde el porcentaje de curación llega a ser de 85% a 90%. Las recurrencias en estas pacientes es del 10% a 25%, las cuales se presentan hasta en el 64% en los primeros 2 años en lugares como pelvis (60%), en la pelvis y a distancia (20%) y solamente a distancia (20%).¹¹

Entre las pacientes tratadas, la supervivencia a los 5 años es del 90-95% para los tumores en estadio I, del 50-70% para los tumores en estadio II, del 30% para los tumores en estadio III y de menos del 20% para los tumores en estadio IV.

El tratamiento con radioterapia en etapas tempranas tiene el mismo porcentaje de curación que la cirugía, pero con mayor morbilidad. Las dosis empleadas son de 75-85Grays (Gy), solo con braquiterapia o combinación de radioterapia externa más braquiterapia, donde la pérdida de la función ovárica es el efecto secundario más importante en pacientes premenopáusicas.¹²

El tratamiento establecido para las etapas localmente avanzadas (Ib2 - IIa2 - IVa) (IIB - IVa) es la quimio-radioterapia concomitante, siendo el cisplatino el agente radio sensibilizador más utilizado.¹¹

EL PAPEL DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN EL CÁNCER CERVICAL

Entre 1974 y 1976, se postuló y analizó por primera vez el posible papel del Virus del Papiloma Humano (VPH) en el desarrollo del cáncer cérvico uterino¹³ cuando Meisels y Fortin describieron en sus publicaciones la aparición de coilocitos en frotis de exudados cervicales indicando la presencia de una infección por virus de papiloma.^{14,15}

Es a principios de los años 80's cuando la relación entre el CC y VPH fue demostrada por el doctor Harald zur Hausen¹⁶, quien realizó experimentos de hibridación observando que las verrugas genitales y tejidos de cáncer cervical contenían material genético del virus del papiloma humano.^{17, 18}

Actualmente datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que del 100% de los casos reportados de cáncer de cervical, el 99.8% de ellos se ha asociado al VPH determinándolo como agente etiológico de esta enfermedad.¹⁹

2.1 Características generales del VPH

El VPH pertenece a la familia Papillomaviridae distribuido ampliamente en la naturaleza y que ha mostrado un tropismo por epitelio escamoso.²⁰

Alrededor de 200 tipos de VPH han sido identificados, de los cuales 40 infectan el tracto genital²¹ y de acuerdo a su potencial para inducir una transformación maligna se clasifican en tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) y los de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81).²²

El VPH se encuentra estructurado por una cápside de 72 capsómeros con un diámetro aproximado de 55nm que en su interior contiene al genoma viral conformado de 8000pb de ADN de doble cadena.

El material genético de este virus se divide en tres regiones para su estudio: la región larga de control (LCR), la región que corresponde a las proteínas tempranas (E1 a E8) y la región que corresponde a las proteínas tardías (L1 y L2) (Figura 6).

2.1.1 Región larga de Control

Presenta un tamaño de 500-1000pb cuya función principal es el origen de la replicación y la regulación de la expresión génica del VPH.

2.1.2 Proteínas estructurales

También llamadas proteínas tardías. L1 y L2 son proteínas estructurales de los capsómeros. L1 representa el 80% de la partícula viral y es una proteína de 57kD mientras que L2 conforma el 20% con un tamaño de 43 a 53kD.

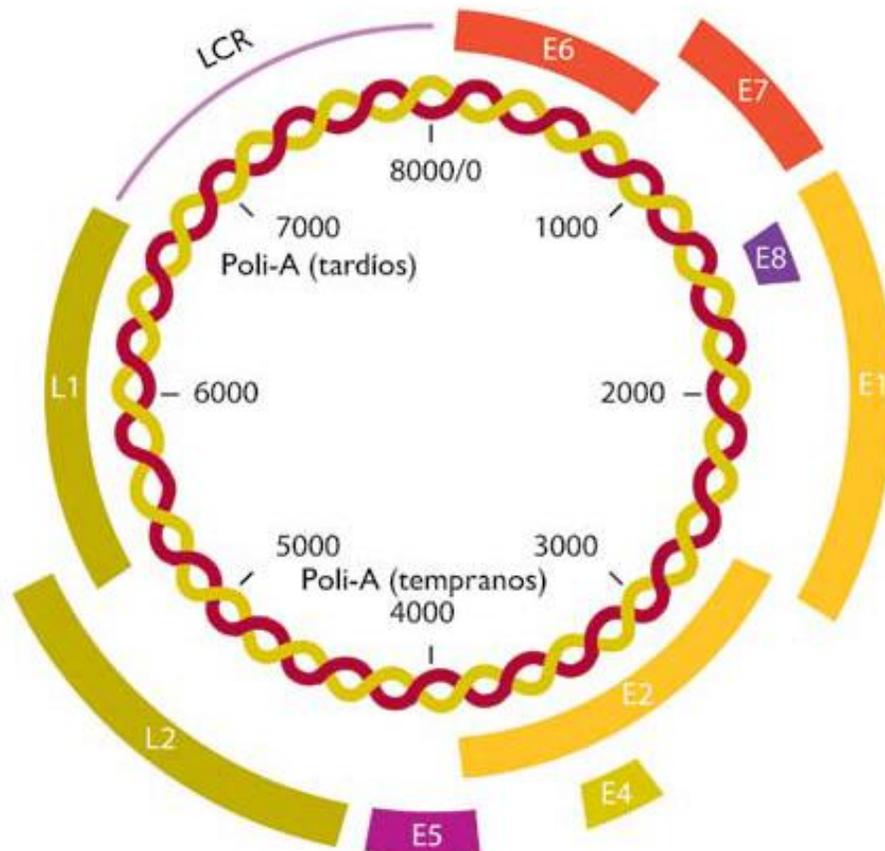


Figura 6. Organización del genoma del VPH. LRC región larga de control. E1-E8 proteínas tempranas L1 y L2 proteínas tardías. En rojo, sección del genoma que codifica para las oncoproteínas E6 y E7. Tomada de López A. et. al⁵

2.1.3 Proteínas funcionales

E1. Está codificada en el gen más grande con casi 2kb de secuencia. Es una helicasa hexamérica dependiente de ATP que participa en la replicación del ADN viral.

E2. El gen que la codifica posee un tamaño aproximado de 1100pb y su producto es una proteína nuclear de 45KDa. El extremo amino terminal de esta proteína es el responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. E2 también tienen una función anti proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como el consecuente aumento de p53.

E4. La secuencia codificante de E4, aproximadamente de 260pb, está contenida dentro del marco de lectura de E2. La proteína E4, de 10 a 44kDa contribuye al egreso del virus de las capas superiores del epitelio mediante el rompimiento de los complejos de citoqueratina.²³

E5. Proteína de 90 aminoácidos que tiene un peso de 14kDa. Es hidrofóbica y se encuentra principalmente en membrana del retículo endoplásmico y Golgi aunque también en membrana citoplasmática. Se ha demostrado que previene la apoptosis después del daño al ADN. Su función principal es el formar complejos que sobrerregulan la actividad de receptores de factores de crecimiento como el EGFR y el PDGFR.²⁴

2.1.4 Oncoproteínas

La transformación maligna de la célula, debida a VPH de alto riesgo, se deriva de la función de las proteínas funcionales E6 y E7 también conocidas como oncoproteínas. Estos dos factores actúan cooperativamente y su expresión es necesaria para el mantenimiento del fenotipo transformado. En últimos estudios E5 se le ha propuesto como oncoproteína por contribuir a la actividad de E6 y E7 mediante la modulación del tránsito de proteínas de señalización a través del retículo endoplásmico. La expresión en E5 aumentó la señalización del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y la activación de la vía MAPK, lo que aumenta las actividades de E6 y E7²⁵ (Figura 7).

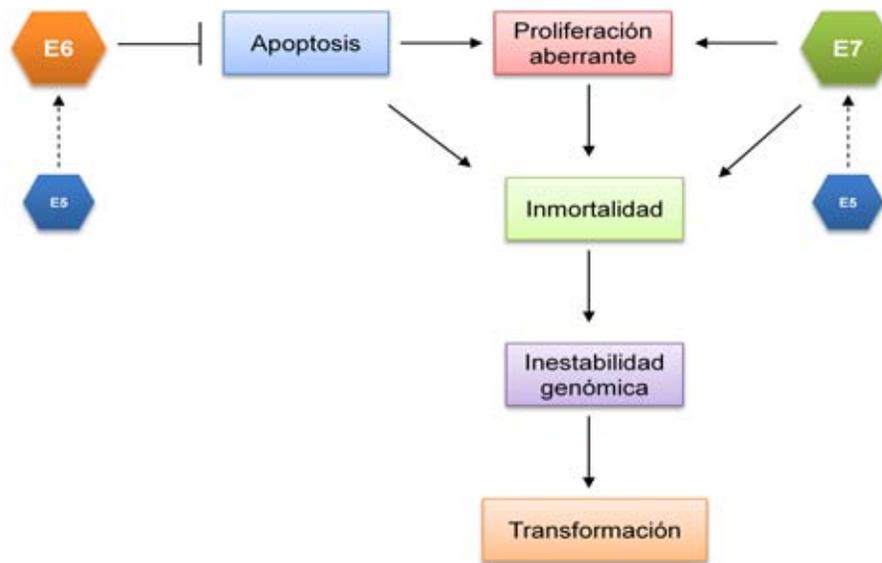


Figura 7. Actividad cooperativa de las oncoproteínas en la carcinogénesis cervical. Procesos celulares en los que las oncoproteínas participan cooperativamente para favorecer el desarrollo del fenotipo tumoral. Tomada y modificada de Cary A. et al²⁵.

E7. Es una proteína nuclear de 13kDa que se une a miembros de la familia RB (p105, p107, p130) a través de un motivo conservado presente en su extremo carbonilo terminal. La familia Rb controla la transición de la fase G1→S del ciclo celular a través de la regulación de la actividad de factores de transcripción de la familia E2F. Los sitios de unión E2F se encuentran en promotores de algunos genes que están involucrados en la regulación de la progresión del ciclo celular, diferenciación, mitosis y apoptosis. Su unión con la proteína E7 de VPH de alto riesgo interrumpe la formación del complejo RB-E2F lo que resulta en la expresión constitutiva de genes sensibles a E2F tales como ciclina A y ciclina E promoviendo un inicio prematuro de la fase S y síntesis de ADN.²⁴ La proteína E7 no solo forma complejos con miembros de la familia RB, también los dirige a su degradación proteosomal dependiente de ubiquitina.^{13, 26} Además, la proteína E7 de VPH de alto y bajo riesgo puede unirse indirectamente a la ciclina E y al complejo ciclina A-CDK2 a través de RB, p107 y p130, así como directamente a la CDK2 permitiendo la actividad sostenida de CDK2, un importante regulador de la entrada y progresión de la fase G1 a S. E7 también se asocia a otras proteínas como desacetilasas de histonas, AP1 e inhibidores de los complejos CDK, como p21 y p27 (Figura 8).

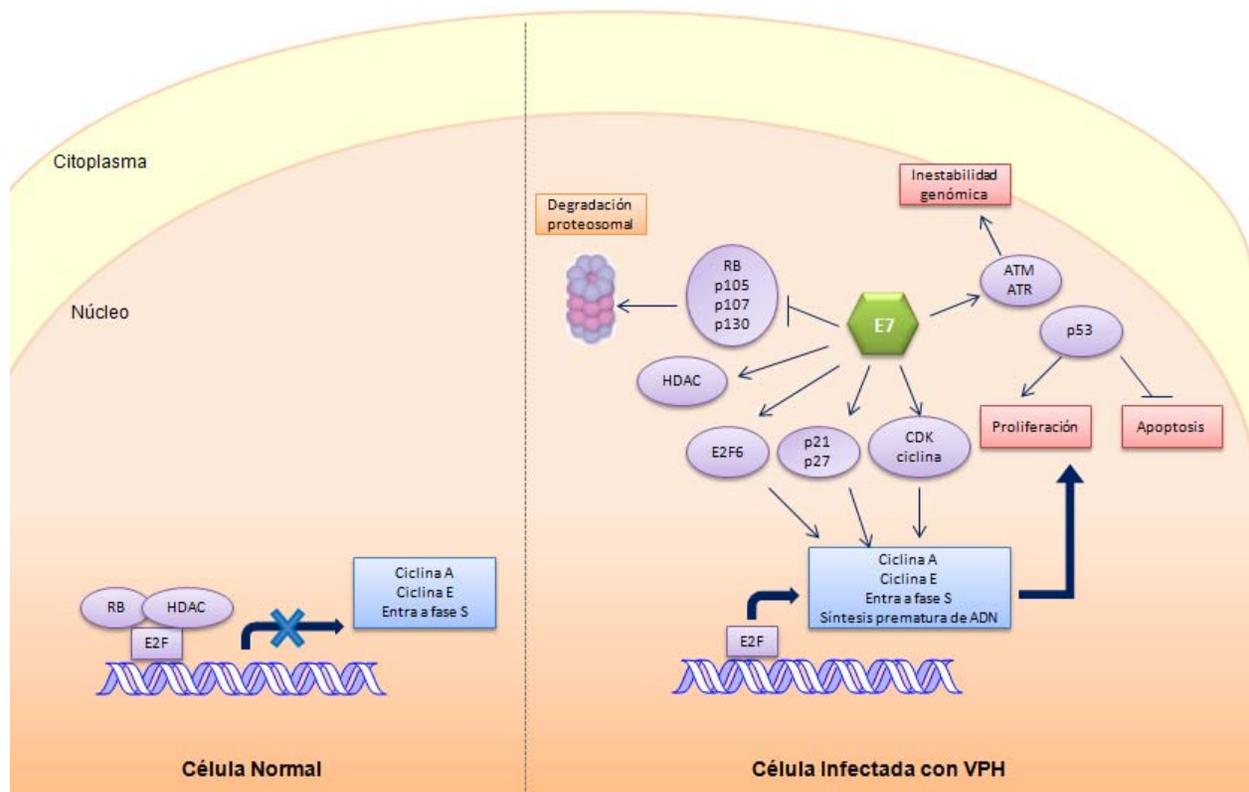


Figura 8. Participación de la oncoproteína E7 en la transformación celular. La oncoproteína E7 del VPH afecta numerosos procesos celulares a través de la interacción con múltiples proteínas. Tomada y modificada de Cary A. et al²⁵.

E6. Proteína de casi 150 aminoácidos con un peso molecular de 18kDa aproximadamente. Interactúa con p53 bloqueando su actividad seguida de la degradación por la vía de la ubiquitina de este supresor de tumores.²⁷ Se ha observado que E6 también puede retener a p53 en el citoplasma impidiendo así su translocación al núcleo inhibiendo su función independientemente. El principal resultado de esta actividad es una resistencia a la apoptosis. Adicionalmente la sobre activación de la telomerasa y la inhibición de la degradación de las cinasas de la familia SRC por esta oncoproteína parece cumplir funciones en la estimulación del crecimiento¹⁶ (Figura 9).

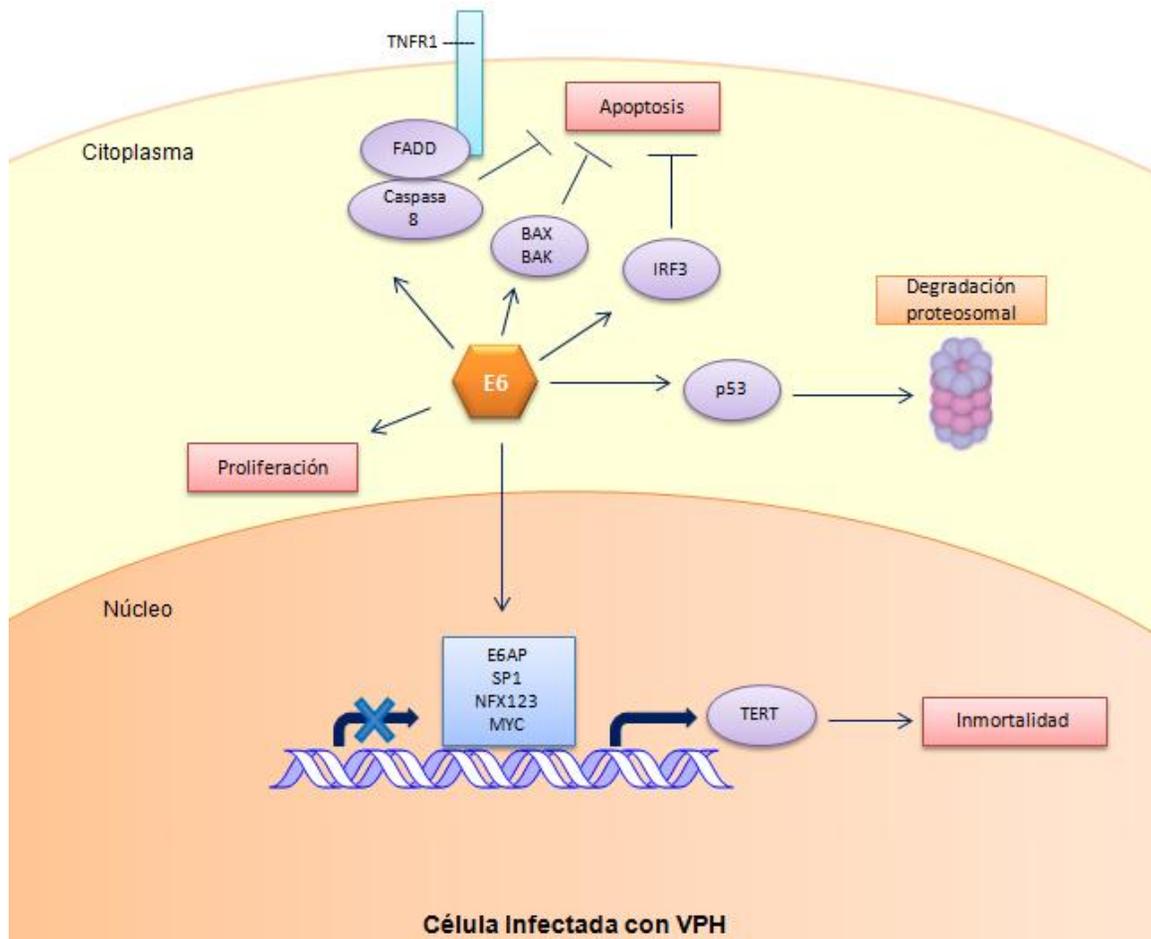


Figura 9. Participación de la oncoproteína E6 en la transformación celular. La oncoproteína E6 del VPH afecta numerosos procesos celulares a través de la interacción con múltiples proteínas. Tomada y modificada de Cary A. et al.²⁵

2.2 Ciclo viral e infecciones persistentes

La infección por VPH requiere la disponibilidad de células epiteliales de la epidermis o de la mucosa que son todavía capaces de proliferación (células de la capa basal).¹⁶ Las partículas infecciosas entran a las células basales a través de una abertura en el epitelio estratificado, ya sea por una lesión o trauma en el epitelio. La internalización del virus a la célula se lleva a cabo por endocitosis de vesículas cubiertas de clatrina.²⁸ Después de la infección, se establecen los genomas de VPH como elementos extracromosómicos o episomas. El genoma del VPH no codifica para polimerasas u

otras enzimas necesarias para la replicación viral siendo indispensable utilizar las proteínas de replicación de la célula hospedera para realizar la síntesis del ADN viral.²⁹ La infección inicial es seguida de una fase de proliferación para incrementar el número de células basales que contienen el genoma viral. Para la inserción del material genético del VPH al genoma del hospedero, se debe linealizar (por ser circular) siendo el corte más común en la región E1 o E2, posteriormente la integración ocurre cerca de los sitios frágiles comunes y regiones de inestabilidad genómica del hospedero. En la fase productiva del ciclo de vida del VPH, la expresión de E6 y E7, bajo el control del promotor temprano en la LCR, evita que las células de la capa basal interrumpan el ciclo celular una vez que estas migran al estrato suprabasal del epitelio promoviendo así la proliferación de las células suprabasales indiferenciadas, además de la evasión de la apoptosis. Esto conduce a la acumulación de daños en el ADN y las mutaciones, que pueden resultar en la transformación y desarrollo de carcinomas.^{5, 30} (Figura 10).

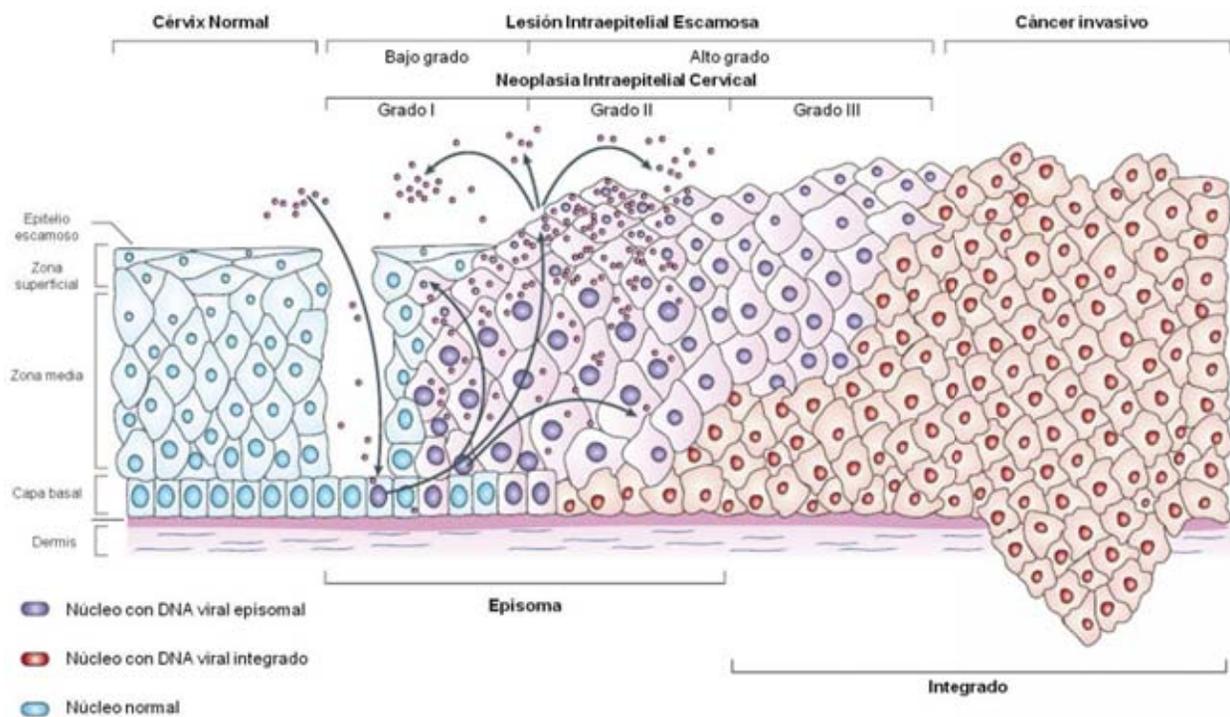


Figura 10. Ciclo viral del VPH. Progresión del cáncer cervical mediado por el VPH. Tomada y modificada de Ciaran B. Et. Al.²⁹

La incapacidad del sistema inmune para eliminar infecciones persistentes del VPH pueden conducir al desarrollo de cáncer cervical después de que varias décadas. En lesiones precancerosas, el genoma del VPH persiste en un estado episomal mientras que, en muchas lesiones de alto grado, los genomas se encuentran integrados en el cromosoma del huésped. Se ha identificado que la infección con cualquiera de los 15 tipos de VPH de alto riesgo, es necesaria más no suficiente para el desarrollo del CC.³¹

CÁNCER

El cáncer se ha definido como un grupo de enfermedades caracterizadas por alteraciones genéticas tales como mutaciones, anormalidades cromosómicas, reactivación de protooncogenes etc. promueven el desarrollo de células tumorales.³² Durante la tumorigénesis las células cancerosas adquieren, a través de una de múltiples pasos, un nuevo conjunto de propiedades que les permite superar la homeostasis fisiológica. Estas propiedades promueven una proliferación ilimitada celular, la autosuficiencia en señales de crecimiento, resistencia a las señales antiproliferativas, resistencia a señales apoptóticas y evasión del sistema inmune entre otros³³ (Figura 11).

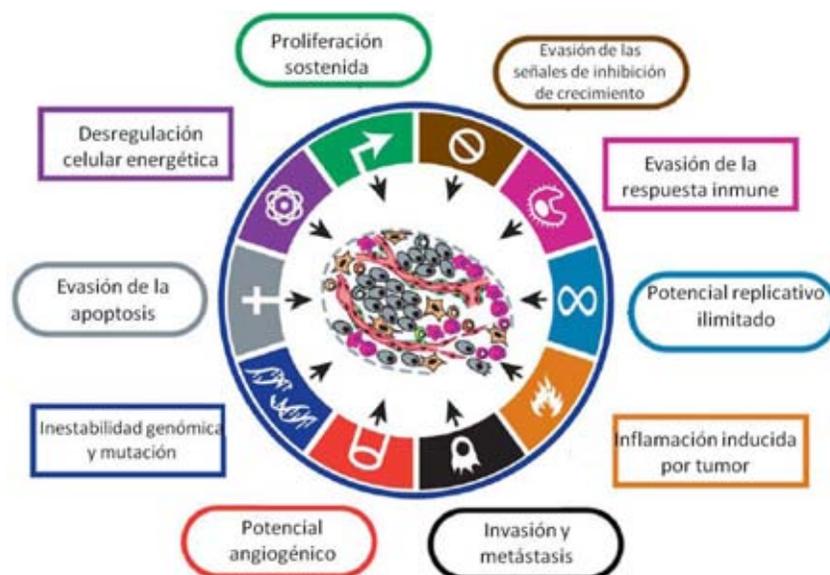


Figura11. Características distintivas de las células neoplásicas. Tomada y modificada de Hanahan D y Weinberg, 2011.³³

La definición de cáncer se ha visto modificada ya que cada vez es más evidente la existencia de modificaciones epigenéticas que, en diferentes estudios, han demostrado su importancia durante el desarrollo y progresión de la enfermedad.^{34, 35, 36, 37}

3.1 Alteraciones epigenéticas en el desarrollo de cáncer

El primero en introducir el término epigenética fue Conrad H. Waddington en 1939 para nombrar a las interacciones entre los genes y sus productos que repercuten en el fenotipo³⁸; posteriormente la epigenética fue definida como cambios heredables en la expresión de genes que no se deben a una alteración en la secuencia del ADN.³⁸

Mediante las modificaciones epigenéticas, las células pueden comprometerse a un linaje o función en particular definiendo así la expresión de genes tejido específicos necesarios en procesos biológicos como el desarrollo embrionario e impronta genómica, favoreciendo el mantenimiento de la estabilidad cromosómica e integridad del genoma al proporcionar la anulación de los elementos de transposición adquiridos a lo largo de la evolución.³⁹

Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados está la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales en las histonas que conforman el nucleosoma, y la formación de complejos de cromatina en el núcleo. Estos procesos no son aislados y ocurren simultáneamente en los distintos niveles de compartimentalización del material genético.

3.1.1 Metilación del ADN

El mecanismo epigenético mejor descrito es la metilación del ADN. La metilación tiene un papel crítico en el control de la actividad de genes tejido específico y la arquitectura del núcleo de la célula.⁴⁰ Consiste en la unión covalente de un grupo metilo que en humanos, ocurre en la posición 5 del anillo de citosinas que preceden a guaninas en una misma cadena; estos reciben el nombre de nucleótidos CpG.⁴¹

3.1.2 ADN Metiltransferasas

La transferencia del grupo metilo de la S-adenosil metionina a la citosina para formar la 5metil citosina (5mC) es catalizada por enzimas conocidas como ADN metiltransferasas (DNMTs) (Figura 12). Tres DNMTs se han caracterizado en eucariontes superiores: DNMT1 reconoce ADN hemimetilado generado durante la replicación para después metilar los dinucleótidos CpG cuyos homólogos en la cadena molde ya están metilados.^{42, 40} DNMT3A y DNMT3B funcionan principalmente como metiltransferasa de novo y están altamente expresadas para establecer la metilación de ADN durante la embriogénesis y mínimamente expresadas en tejido adulto.⁴³

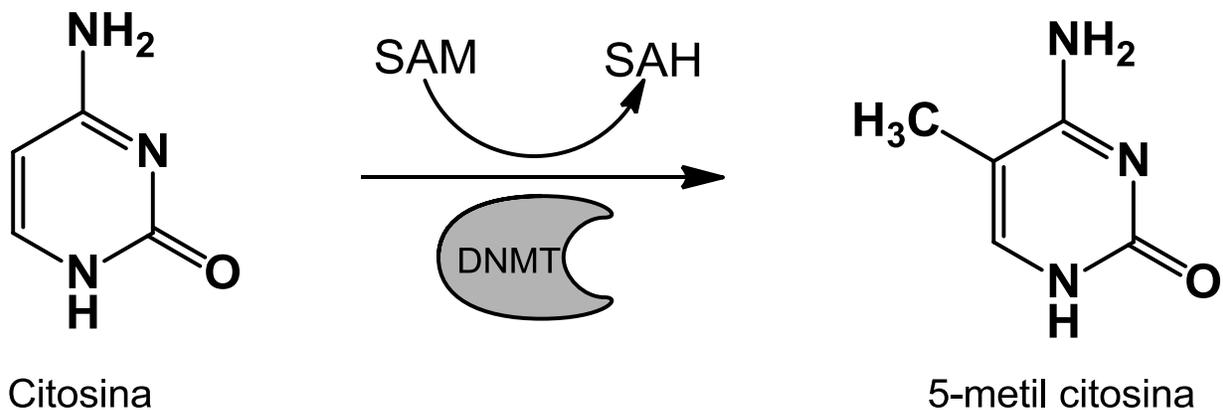


Figura 72. Participación de las ADN metiltransferasas (DNMTs) en la metilación del ADN. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo CH_3 de la S-adenosilmetionina a la posición 5 de la citosina.

La metilación del ADN proporciona un mecanismo de señalización para varias proteínas que reconocen este sitio de metilación e interactúan con la cromatina. Ejemplos de estas son las MBD1, MBD2, MBD3 y MeCP2 que a su vez funcionan como proteínas reclutadoras de enzimas modificadoras de histonas, para coordinar los procesos de reordenamiento de la cromatina. La metilación se observa principalmente en regiones centroméricas, telómeros, cromosoma X inactivo y secuencias repetidas.⁴⁴

3.1.3 Islas CpG

Usualmente los nucleótidos CpG se concentran en regiones denominada islas CpG. Estas se distribuyen de una manera no aleatoria en todo el genoma humano y, a menudo, abarcan la región promotora y el primer exón de los genes. Las islas CpG se caracterizan por tener una longitud de 0.2 a 4kb, con un contenido de CG mayor al 50% y una relación mayor a 0.6 del número observado de dinucleótidos CG entre el número esperado en base al número de guaninas y citosinas en el segmento.⁴⁵ La relación de CpG observado con respecto al esperado se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Observado/Esperado} = [(\# \text{ CpG})(\text{Long. de secuencia})]/[(\#C)(\#G)]$$

El análisis computacional de la secuencia del genoma humano predice cerca de 29,000 islas CpG^{46, 47} y se ha demostrado que la gran mayoría no está metiladas en todos los estados del desarrollo ni en todos los tipos de tejidos. Aproximadamente 60 al 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están.⁴⁸

3.2 Metilación del ADN en células normales

En células normales el 50-70% de todos los sitios CpG están metilados, principalmente en regiones de heterocromatina propias de la diferenciación y especialización celular. En contraste las islas CpG de eucromatina se encuentran localmente no metiladas permitiendo el acceso de factores de transcripción y proteínas asociadas a la cromatina para la regulación y expresión de los genes.

La hipermetilación o ganancia de metilación en una célula normal contribuye al silenciamiento de genes. La impronta genómica, requiere la hipermetilación de uno de los alelos de los padres para asegurar la expresión monoalélica, como ocurre en la inactivación de un cromosoma X en mujeres. La hipermetilación de secuencias genómicas previene la inestabilidad cromosómica, las traslocaciones y la interrupción de genes causadas por la reactivación de secuencias de ADN transponibles.^{49, 50}

La ausencia de la metilación en una célula normal contribuye a la expresión tejido específico y genes necesarios para el mantenimiento y buen funcionamiento del ciclo celular (Figura 13).

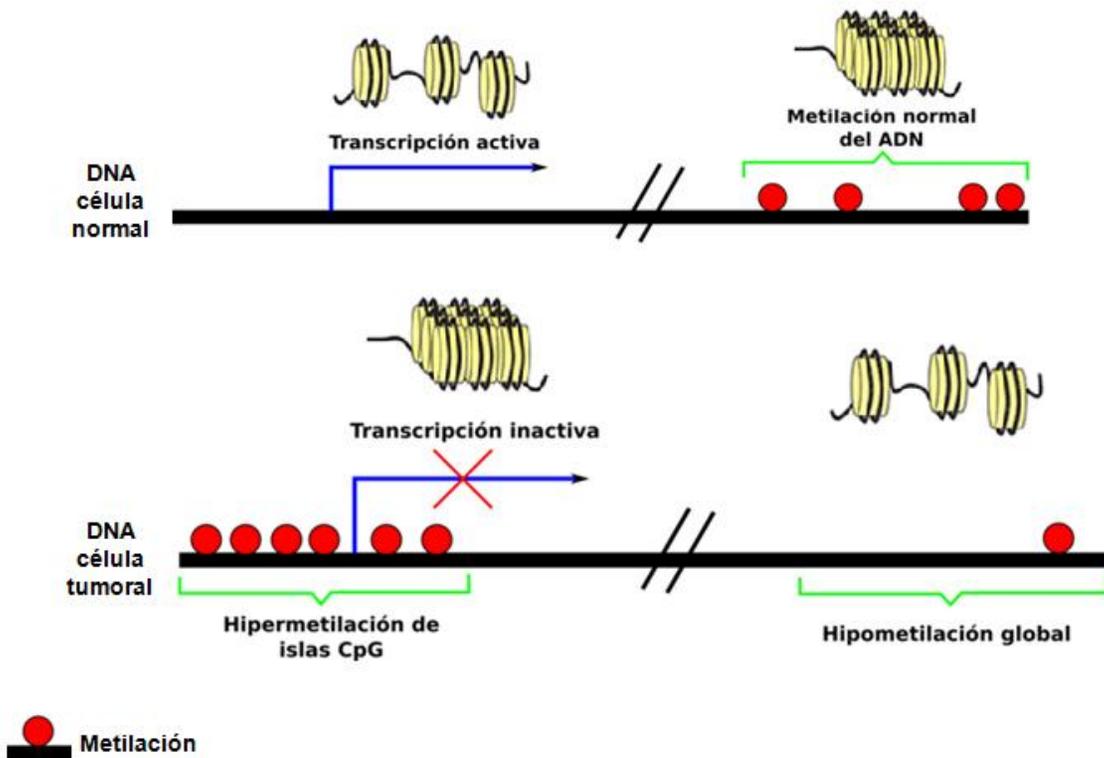


Figura 83. Metilación del ADN en células normales y tumorales. Metilación global y local del ADN en células normales (arriba) y células tumorales (abajo).

3.3 Metilación del ADN y cáncer

El proceso de carcinogénesis comprende una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en la célula, que terminan por permitir su crecimiento no regulado. Entre las alteraciones genéticas se encuentra la presencia de mutaciones en genes claves que participan en la regulación del ciclo celular y promueven el crecimiento anormal de las células.⁵¹

La programación de la expresión génica mediada por las modificaciones epigenéticas puede verse alterada por muchos factores como lo son la exposición a agentes químicos durante las etapas embrionaria, fetal y postnatal, alteraciones en genes que

intervienen en la síntesis de las enzimas ADN metiltransferasa o desacetilasas de histonas, radiaciones, metabolitos de la dieta, etc. y particularmente se ha observado un desbalance en el patrón de metilación del ADN en distintos cánceres esporádicos.

La hipermetilación de las islas CpG en regiones promotoras de genes supresores de tumores, es el principal evento en el origen de algunos cánceres. Está asociado con una pérdida de la función del gen, que al igual que las mutaciones, puede proporcionar una ventaja selectiva a las células neoplásicas y predisponer a eventos mutacionales durante la progresión tumoral, observándose esta hipermetilación principalmente en regiones genómicas que se caracterizan por frecuentes deleciones cromosómicas^{41,52}.

Por otra parte, la hipometilación del ADN contribuye al desarrollo del cáncer al favorecer la inestabilidad cromosómica, recombinación genómica, reordenamientos cromosómicos (deleciones, traslocaciones), la reactivación de transposones, la pérdida de la impronta genómica, entre otras⁵³ por la conformación que toma el ADN a eucromatina (Figura 13).

ANTECEDENTES

Aunque la mayoría de las mujeres durante su vida adquieren algún tipo de VPH, tan solo el 1% de ellas desarrollarán cáncer cervical. La infección con cualquiera de los 15 tipos de VPH de alto riesgo es una condición necesaria pero no causa suficiente para desarrollar cáncer de cérvix⁵⁴, además de ella se requieren alteraciones genéticas y modificaciones epigenéticas, mismas que en diversos estudios han demostrado su importancia durante el desarrollo y progresión de la enfermedad precancerosa a cáncer invasivo.⁵⁵

La metilación del ADN es un evento epigenético frecuente en muchos tipos de cáncer. Numerosos estudios describen la importancia de la metilación del ADN centrándose principalmente en la que tiene lugar en regiones del genoma con significado funcional resultando en la pérdida (silenciamiento de genes supresores de tumores a través de la metilación del ADN en islas CpG, en cooperación con otros mecanismos epigenéticos)^{56, 57} o ganancia de la actividad génica (a través de la desmetilación de islas CpG favoreciendo la transcripción de oncogenes)^{58, 59} y promoviendo el aumento mutagénico debido a la desaminación de 5-metilcitosina a timina, reactivación de transposones o inestabilidad cromosómica. La metilación aberrante del ADN puede entonces desempeñar un papel fundamental en la carcinogénesis ya sea como iniciador (driver) y/o potenciador (passenger) de la enfermedad.³⁹

En estudios de distintos tipos de cáncer, se ha observado que la metilación del ADN presenta patrones asociados con el desarrollo y la progresión de la enfermedad confiriéndole un potencial uso clínico, por lo que se encuentra en estudio como herramienta complementaria de diagnóstico, de factor pronóstico y predictivo de respuestas al tratamiento.

La metilación del ADN es una alteración molecular temprana y frecuente en la carcinogénesis cervical.^{60, 61} Se ha identificado una serie de alteraciones epigenéticas que se producen durante la progresión del cáncer cervical tanto en el genoma del VPH, como en el genoma de la célula del hospedero.⁵⁹ Una de las primeras evidencias fue el

ensayo de incorporación de la [3H]-S- adenosil metionina en tejido neoplásico de cérvix. En dicho estudio se observó que el grado de hipometilación (grado de incorporación del grupo [3H]-metilo) aumentó progresivamente junto con la neoplasia, hecho que fue confirmado posteriormente en estudios que implicaban análisis cuantitativo de metilación del ADN. Se observó una desmetilación progresiva del tejido en las muestras de displasia y cáncer en comparación con los controles normales^{62, 63} y la mayoría de los genes supresores de tumores que poseen regiones promotoras ricas en islas CpG, tendieron a estar hipermetiladas conduciendo a su inactividad. De esta forma, la identificación de las numerosas alteraciones epigenéticas en distintas etapas de la carcinogénesis cervical permite entender el valor potencial de los marcadores de metilación para mejorar el diagnóstico.

Varios estudios han identificado marcadores de metilación en muestras tumorales y de fluidos biológicos (suero/plasma, muestras citológicas, orina) de pacientes con cáncer cervical. Uno de ellos tuvo como objetivo evaluar, por medio de QMSP (metilación específica por PCR cuantitativa), la presencia de genes hipermetilados a partir de raspados cervicales de 30 pacientes con diagnóstico de cáncer cervical (20 carcinomas de células escamosas y 10 adenocarcinomas) y 19 mujeres con diagnóstico histológico de cérvix normal. De manera general se observó que los promotores de los genes CALCA, DAPK, ESR1, TIMP3, APC y RARβ2 estuvieron hipermetilados con una frecuencia significativamente mayor en cáncer que en los controles; además, los adenocarcinomas presentaron los valores más altos de metilación. Se observó que el estado de metilación de los promotores de 4 genes (CALCA, DAPK, ESR1 y APC) parece tener una mejor sensibilidad y especificidad en la detección y evaluación de VPH de alto riesgo en comparación con el método clásico citológico.⁶⁴

Por otra parte, ha sido de interés estudiar el estado de metilación de genes clave en la regulación de procesos celulares como lo es la reparación del ADN. Se comprobó que genes como Ciclina 1A (CCNA1) que participa en la reparación del ADN de doble cadena posterior a la radiación, presentan su región promotora metilada en cáncer

cervical además de que el grado de metilación aumenta según avanza la oncogénesis a cáncer invasivo.⁶⁵ En otros estudios se ha comprobado que genes como O6-metilguanina-ADN metiltransferasa (MGMT) se encuentra silenciada por metilación en su región promotora en eventos tempranos del cáncer cervical (al igual que en muchos otros tipos de neoplasias) y aumenta a medida que avanza el cáncer cervical.^{66, 67} El gen MGMT codifica una proteína de reparación del ADN que acepta grupos alcalinos desde la posición O6 de la guanina, de este modo se impide la transición de guanina a adenina evitando mutaciones en el genoma. Otros genes relacionados con la reparación del ADN que son silenciados por la metilación en su región promotora pero en menor frecuencia son hMLH1 y FANC.⁵⁹

Existe evidencia en la que la expresión de genes clave para la muerte celular programada podría estar regulada por mecanismos epigenéticos, en especial la metilación del ADN. Por ejemplo, el silenciamiento transcripcional de p73 está regulado por la metilación en los residuos de citosinas de dinucleótidos CpG presentes en regiones promotoras y en el primer exón del gen P73. Esta proteína es un miembro de la familia de p53 capaz de inducir apoptosis por su fuerte homología estructural y funcional con esta proteína. Cuando se sobreexpresa, posiblemente favorece la activación de la transcripción genes como P21, BAX, MDM2, y GADD45 para la inducción de la apoptosis. En un estudio se observó que el 38.8% de las muestras con cáncer cervical presenta hipermetilación del gen P73 en comparación con el 3.2% de las muestra control, donde además la hipermetilación de P73 se relacionó significativamente con la reducción o supresión de la expresión de p73.⁶⁸ Este comportamiento también se ha reportado en leucemias, linfomas, tumores cerebrales y líneas celulares de cáncer de ovario.^{69, 70} Otro gen proapoptótico que además inhibe potencialmente la metástasis, es DAPK. Un gran número de estudios han observado consistentemente su estado hipermetilado en cáncer cervical, por los que se propone como marcador para la detección de esta enfermedad.⁷¹ Otro regulador clave de la apoptosis es RASSF1A cuyo promotor se ha observado hipermetilado con la posterior disminución de su expresión en varios tumores malignos, sin embargo este

comportamiento no se ha comprobado en líneas celulares de cáncer cervical positivas para VPH.

Entre los estados de metilación de genes importantes para la diferenciación y desarrollo celular se encuentran genes de la vía de WNT. En muchos tipos de tumores la inactivación de APC, PTEN u otros antagonistas de WNT contribuye a la proliferación incontrolada. APC puede ser inactivado por la hipermetilación en el promotor en cáncer cervical, de ovario y del endometrio.⁷² La hipermetilación de PTEN puede ser un evento tardío en la carcinogénesis cervical, ya que se observó con menor frecuencia en lesiones de bajo y alto grado, pero en pacientes con recurrencia o cáncer cervical fatal tuvo un porcentaje significativamente mayor de metilación, lo que sugiere que PTEN podría poseer una importancia pronóstica y servir como predictor de la supervivencia libre de enfermedad.⁷³

También han sido evaluados los estados de metilación en genes importantes para la adhesión y migración celular. Algunos ejemplos son el estudio de la metilación aberrante de islas CpG en regiones promotoras del gen CDH1 y su asociación con la pérdida de la actividad transcripcional frecuente en cáncer cervical invasivo particularmente de células escamosas.⁷⁴ Inhibidores tisulares endógenos de metaloproteasas de la matriz (TIMP-2 y TIMP-3) poseen actividad antitumoral y anti-angiogénico. La inactivación de TIMP-3, por la hipermetilación del promotor, se ha descrito como característica de adenocarcinomas⁷⁵, mientras que la metilación en el promotor de TIMP-2 tiene una incidencia mayor en el cáncer de células escamosas.⁷⁶ La molécula de adhesión celular 1 (CADM1) participa en la adhesión celular epitelial, y la pérdida de su expresión se ha ligado con la invasión y/o metástasis del cáncer. La hipermetilación del promotor de este gen se asoció con la reducción en la expresión de su proteína en lesiones intraepiteliales de alto grado y cáncer cervical de células escamosas.⁷⁷ Estudios recientes sugieren que la metilación del CADM1 puede ser un marcador epigenético útil para la clasificación de tumores con VPH+ de alto riesgo con predisposición a desarrollar una displasia.⁷⁸

Estudios realizados en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, SiHa, CaSki, y C4I) para obtener información sobre el estado de metilación, arrojó 23 genes cuya metilación aberrante en los ensayos celulares sugirió s potencial uso diagnóstico. Para comprobar esta hipótesis, se evaluó la metilación en carcinoma cervical invasivo (CCI) donde SPARC y TFPI2 mostraron la mayor frecuencia de metilación aberrante en las muestras, encontrándose ambos hipermetilados en todos menos uno de los casos examinados.⁷⁹ Adicionalmente hay evidencia de que HS3ST2 se encuentra hipermetilado en 93% de los tejidos de cáncer y 70% de muestras NIC III (carcinoma in situ); así mismo, en este estudio se reporta que CDH1 se encontró en 89% de los cánceres y 26% de muestras NIC III. En ningún caso se observó una metilación importante de ambos genes en tejidos cervicales normales apoyándose la idea de que estos fueran posibles marcadores de cáncer cervical y sus etapas precursoras⁸⁰. HS3ST2, CCNA1, PAX1, DAPK1 y TFPI2 también fueron estudiados por otro grupo de investigación utilizando la correlación entre los resultados citológicos, histológicos y datos de metilación del ADN obtenidos por la técnica MethyLight. A partir de muestras cervicales en diferentes grados de displasia, se determinó que HS3ST2 era el candidato más significativo para diferenciar entre lesiones de bajo grado y lesiones de alto grado-carcinoma con una sensibilidad y especificidad entre 70 y 80% proponiéndolo como un gen candidato para mejorar la precisión diagnóstica de la neoplasia cervical.⁸¹

En la búsqueda de biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad, se han realizado ensayos de inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP) en combinación con microarreglos a partir de muestras de lesiones intraepiteliales de alto grado, mediante los cuales, se obtiene un panorama general del estado de metilación del todo el genoma. A partir de los resultados y de la comparación con muestras de tejido cervical normal, se identificaron las regiones diferencialmente metiladas (DMR's), las que posterior a su validación por técnicas como BSP y MSP, revelaron que la frecuencia y nivel relativo de metilación fue significativamente diferente entre las muestras normales y cancerosas, así como COL25A1 y KATNAL2 fueron dos genes cuyo aumento de la metilación observada sobre la progresión podría insinuar un papel regulador en la carcinogénesis.⁸²

Otras técnicas como la pirosecuenciación se han utilizado para determinar de manera cuantitativa los niveles de metilación de diversos genes en cáncer cervical. Uno de ellos, DKK3, se distinguió por estar asociado a un peor pronóstico de supervivencia en un grupo de 62 pacientes con cáncer cervical de células escamosas. Cabe destacar que de este gen se evaluaron 5 posiciones CpG dentro de su región promotora, de las cuales 4 de ellas presentaron niveles elevados de metilación además de estar asociadas a muestras de pacientes en estado avanzados de la enfermedad confiriéndole un valor pronóstico.⁸³

Uno de los estudios más recientes evaluó la metilación de RASSF2, un gen que anteriormente se le ha implicado en la progresión de varios tipos de cáncer como el de mama, colorrectal y de pulmón. Se analizó la metilación del promotor de este gen por MSP, la pérdida de la expresión de su proteína por medio de inmunohistoquímica de tejidos tumorales y se corroboró su reexpresión utilizando 5-aza-2'-desoxicitidina en líneas celulares de cáncer cervical. En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que RASSF2 funciona potencialmente como un nuevo gen supresor de tumores que se inactiva a través de hipermetilación en cáncer cervical y se relaciona con un mal pronóstico.⁸⁴

Existen varias revisiones que tienen como objetivo generar un compendio de la información publicada por distintos grupos de investigación acerca de los resultados observados en el estado de metilación de distintos genes, sin embargo resulta difícil dada la heterogeneidad de los resultados tanto por los métodos de análisis, las distintas etapas de progresión de la neoplasia de las muestras, el número de muestras y alcances de la investigación. Una de las revisiones más notables es la realizada con 51 estudios que consideran el análisis de un total de 68 genes para determinar su metilación en 4376 muestras a (a través de todas las etapas de la carcinogénesis cervical) y utilizando principalmente las metodologías MSP y QMSP. A través de esta revisión se puede observar una consistencia en la hipermetilación principalmente de tres genes: DAPK1, CADM1 y RARB, (Figura 14).⁸⁵

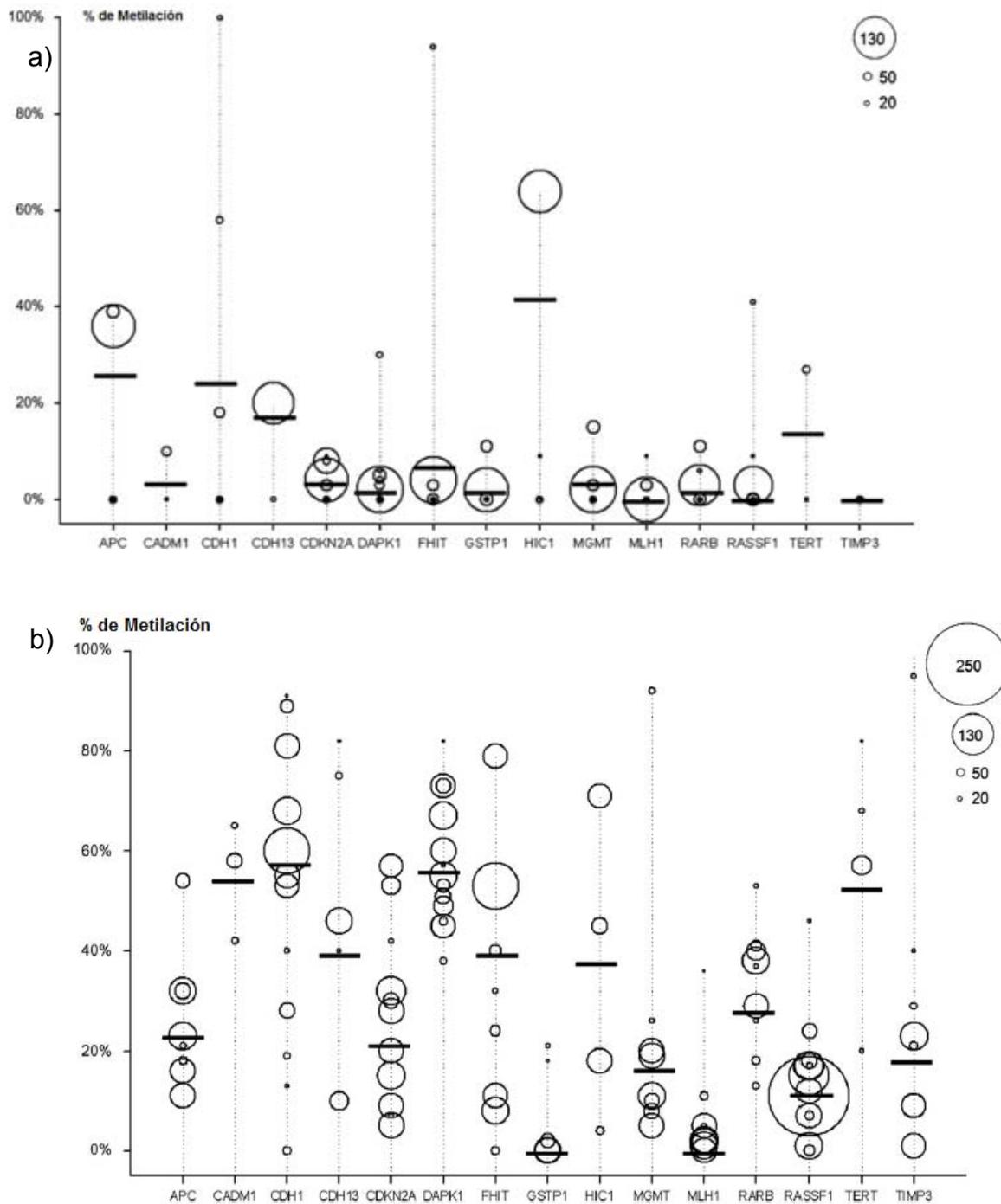


Figura 14. Frecuencia de metilación de la región promotora de 15 genes reportados en diversos estudios. a) Frecuencias de metilación para 15 genes en tejido normal cervical; b) Frecuencias de metilación para 15 genes en cáncer cervical. El centro del círculo indica la frecuencia notificada. El tamaño del círculo indica el tamaño del estudio. Las líneas horizontales indican la frecuencia de metilación promedio ponderado de ese gen en base a todos los estudios. Tomada de Wentzensen, N. et al.⁸⁵

En un esfuerzo por recopilar información sobre la metilación de genes en distintos tipos de cáncer necesaria para la comprensión y determinación de eventos epigenéticos en el desarrollo de los mismos, se han generado herramientas en línea que facilitan la búsqueda de información sobre algunas neoplasias. En particular, Pubmeth es una base de datos de metilación en cáncer que soporta su información en textos de la literatura Medline/Pubmed y en anotaciones de resúmenes preseleccionados, filtrados y ordenados manualmente. En esta base de datos se puede realizar búsquedas gratuitas para extraer información como frecuencia de metilación de diversos genes en distintos tipos de cáncer⁸⁶. Al realizar una búsqueda de información en cáncer cervical y cáncer cervical de células escamosas se obtiene la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de metilación de distintos genes en cáncer cervical

Gen	Cáncer cervical	Cáncer cervical de células escamosas
RASSF1	798	413
CDKN2A	696	226
DAPK1	690	179
CDH1	433	271
MGMT	586	160
APC	397	113
FITH	334	82
TIMP3	252	148
HIC1	214	31
PTEN	199	62
ZMYND10	127	104
RARB	191	20
CADM1	75	52
BRCA1	82	-
HLTF	92	-
RUNX3	40	-
TIMP2	36	-
CCNA1	30	30
POU2F3	46	-
TERT	45	-
DLC1	8	-
PTGS2	82	82
SSYK	73	-

Continuación. Tabla 2

Gen	Cáncer cervical	Cáncer cervical de células escamosas
CCND2	54	-
TWIST1	56	-
SFN	70	-
ASC	89	-
CDH13	89	-
CDKN2B	82	-

Frecuencia	0	0-20%	40-60%	40-60%	60-80%	80-100%
------------	---	-------	--------	--------	--------	---------

Los diferentes colores representan la frecuencia de metilación del gen en cáncer cervical (qué porcentaje de las muestras mostraron metilación), mientras que los números indican el número total de muestras reportadas para la metilación.⁸⁶

La metilación en genes selectos resulta importante para determinar biomarcadores que sirvan para un diagnóstico temprano, de igual manera es necesario el desarrollo de biomarcadores cuya metilación sirva para el pronóstico y respuesta al tratamiento.

La quimiorradiación basada en cisplatino ha mejorado significativamente la supervivencia de pacientes con cáncer cervical en estadios avanzados, sin embargo, la sobrevivida de 5 años sigue siendo del 66%⁸⁷ y actualmente no existen biomarcadores disponibles para seleccionar a los pacientes con cáncer cervical que podrían beneficiarse con este tratamiento. Diversos grupos de investigación han centrado sus estudios en determinar biomarcadores que sirvan de pronóstico al tratamiento y en revisiones recientes se resume la información hasta el momento disponible, entre las que se encuentra la realizada por el grupo de Roossink y colaboradores plasmada en la tabla 3.

Por otra parte, ensayos clínicos de diversos tipos de tumores malignos han reportado una mejor respuesta al tratamiento cuando se administra Decitabine (agente desmetilante) antes o en combinación con la terapia estándar, posiblemente a la reexpresión de genes supresores de tumores; sin embargo, no todos los pacientes pueden beneficiarse por el uso de agentes desmetilantes ya que son susceptibles a la reexpresión de oncogenes que podría resultar en mecanismos de resistencia al tratamiento. Por tanto, es necesario generar paneles de genes cuya metilación sea útil para optimizar la planificación del tratamiento personalizado.⁸⁶

Tabla 3. Biomarcadores reportados en la literatura basados en la hipermetilación del ADN en relación con respuesta a la terapia

GEN	VÍA	TEJIDO	C	P	TERAPIA	RESPUESTA A LA TERAPIA
TGM2		CP	X		Cisplatino	Menos resistentes
SAT1		CCb y Cu	X		Cisplatino	Más resistentes
ASS1		CO		X	Cisplatino	Peor pronóstico
S100P	Ca2+	CCb y Cu	X		Cisplatino	Más resistentes
SFN	RDD	CP		X	Cisplatino	Mejor pronóstico
BRCA1	RDD	CO		X	Cisplatino	Mejor pronóstico
ERCC1	RDD	CM	X	X	Cisplatino	Mejor pronóstico
ATM	RDD	CCR, CM	X		RT	Mejor pronóstico
FANCF	RDD	CO, CC	X		RT	Mejor pronóstico
MLH1	RDD	CO	X		Cisplatino	Peor pronóstico
MLH1		CO	X	X	Cisplatino	Peor pronóstico
MLH1		CO		X	Cisplatino	Peor pronóstico
HIC1	RDD	CT	X	X	Cisplatino	Peor pronóstico
FANCF	RDD	CO	X	X	Cisplatino	Peor pronóstico
TP73	RDD	CC	X	X	RT	Peor pronóstico
MGMT	RDD	CM		X	RT	Mejor pronóstico
GSTP1	Detoxificación	CG	X		Cisplatino	Mejor pronóstico
TIMP3	Detoxificación	CCb y Cu		X	RT	Mejor pronóstico
RASSF1A	Ras/MAPK	CHC	X	X	Cisplatino	Peor pronóstico
RASSF1A		CT			Cisplatino	Peor pronóstico
RASSF1A		CCb y Cu		X	RT	Peor pronóstico
RASSF2A	Ras/MAPK	CCb y Cu		X	RT	Peor pronóstico
SCGB3A1	Ras/PI3K	CCb y Cu		X	RT	Peor pronóstico
HSULF1	WNT	CO	X		Cisplatino	Respuesta pobre
CDH1	WNT	CCb y Cu		X	RT	Mejor pronóstico
SFRP5	WNT	CO	X	X	Cisplatino	Respuesta pobre
DVL1	WNT	CO		X	Cisplatino	Respuesta pobre
NFATC3	WNT	CO		X	Cisplatino	Mejor pronóstico

C líneas celulares; P pacientes; CP cáncer de pulmón; CCb y Cu cáncer de cabeza y cuello, CO cáncer de ovario; CM cáncer de mama; CCR cáncer de colon; CC cáncer cervical; CT cáncer testicular; CG Cáncer gástrico; CHC cáncer hepato celular; RT radio terapia Tomada de Roossink, F. et al.⁸⁷

A pesar de la urgente necesidad clínica de añadir nuevos predictores de enfermedades, el número de biomarcadores epigenéticos desarrollados hasta el momento es realmente pequeño, por lo tanto, hay una necesidad continua de desarrollar marcadores robustos de progresión de la enfermedad que los existentes como el examen morfológico o pruebas para la presencia de los tipos de VPH de alto riesgo.

Objetivo general

- Determinar el perfil de metilación global de muestras tumorales provenientes de pacientes con cáncer cérvico uterino en etapa localmente avanzado.

Objetivos particulares

- Determinar el perfil de metilación global característico de un grupo de muestras provenientes de tumores de cáncer cérvico uterino localmente avanzado y comparar las diferencias con los perfiles de metilación global de muestras de epitelio sano.
- Determinar el perfil de metilación global característico presente en dos grupos de muestras provenientes de tumores de pacientes cuya respuesta al tratamiento es diferente.

HIPÓTESIS

- El cáncer cérvico uterino, al igual que otros tipos de cáncer, presentará una importante metilación en sus promotores.
- Al comparar el perfil de metilación de muestras provenientes de pacientes con muestras libres de displasia, existirá una pérdida en la metilación global y una ganancia de metilación local de regiones promotoras principalmente en genes supresores de tumores.
- Al comparar el perfil de metilación de dos grupos de muestras tumorales pertenecientes a pacientes con diferente respuesta al tratamiento, existirá un patrón diferencial de metilación asociado a la respuesta al tratamiento.

METODOLOGÍA

Como estrategia experimental en este estudio se incluyeron 22 muestras tumorales de cáncer cervical pertenecientes a pacientes que asisten al Instituto Nacional de Cancerología las cuales se encuentran almacenadas en el repositorio de tumores del Dr. Pérez Plasencia, recolectadas entre los años 2010-2011 y clasificadas como localmente avanzadas por el departamento de patología de dicha institución (Tabla 4).

Asimismo se incluyeron 4 muestras de epitelio normal de cérvix (libres de displasia) donadas por el Dr. Peralta del Instituto de Salud Pública de México y que fueron consideradas en este estudio como muestras libres de carcinoma. Al momento de la biopsia, ningún paciente recibió previamente tratamiento con algún tipo de radioterapia o quimioterapia.

Tabla 4. Características clínico patológicas de las pacientes y muestras consideradas en el estudio.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS	
N=22 (%)	
Tipo Histológico	
Epidermoide	21, (95%)
Adenocarcinoma	1, (5%)
Estadio clínico (FIGO)	
IB2	1, (5%)
IIB	14, (64%)
IIIB	7, (32%)
Edad (29-63) años	
29-39	6, (27%)
40-50	9, (41%)
61-61	5, (23%)
Mayor a 61	2, (9%)
	= 46

Continuación. Tabla 4

Tamaño del tumor	
Mayor	9cm
Menor	0.7cm
	X= 5.23cm
Genotipificación VPH	
16	12, (57%)
52	4, (19%)
18	3, (14%)
58	2, (9%)
33	1, (5%)
31	1, (5%)
6	3, (14%)
59	2, (9%)
39	1, (5%)
Tratamiento	
Platinol	20, (91%)
Sin datos	2, (9%)
Respuesta al tratamiento	
Completa	12, (55%)
Progresiva	10, (45%)
Fallecida	6, (27%)

El ADN de las 22 muestras tumorales fue aislado utilizando el equipo MagNA Lyser de ROCHE con los reactivos, suplementos y metodología que el proveedor recomienda.

De manera general la metodología se compone de las siguientes 6 etapas:

- 1 •Diseño y alineamiento de adaptadores específicos
- 2 •Obtención de la fracción metilada y no metilada
- 3 •Marcaje diferencial de las fracciones con fluorocormos para su hibridación sobre sondas de microarreglos
- 4 •Escaneo de la imagen de los arreglos y obtención de la información
- 5 •Análisis de datos de microarreglos
- 6 •Validación de los resultados por análisis de metilacon con la metodología MSP

1. Diseño y alineación de adaptadores específicos

Para el diseño de los oligonucleótidos que servirán como adaptadores específicos nos basamos en la metodología aPRIMES propuesta por Stefan Pfister y colaboradores⁸⁸; y una vez sintetizados los oligos Lib1 (5'AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT3') y ddMes11 (5'TAACTGACAG3') se resuspendieron a una concentración de trabajo 100µM cada uno. Se preparó el buffer de alineamiento (BA 10X) utilizando MgCl₂ concentración final 0.05M, Tris HCl pH7.6 concentración final 0.2M y NaCl concentración final 0.5M llevando a un volumen final de 5mL de agua estéril. Para el alineamiento se tomaron 9µL Lib1 [100µM] y 9µL de ddMes11 [100µM] y se mezclaron en 2µL del BA 10X. La reacción se incubó a 65°C por 5 min (Figura 15). Terminado el tiempo de incubación, se enfrió a temperatura ambiente y posteriormente se guardó a 4°C por 1 hora. Para verificar la correcta alineación de los oligos "Lib1-Linker" se corrió una alícuota de 2µL en un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa en TBE1X comparándolo con 2µL de los oligos Lib1 100µM. La reacción se almacenó a -20°C.

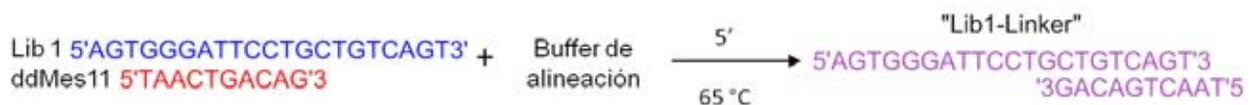


Figura 15. Alineamiento de adaptadores. La alineación de los oligos Lib1 (en azul) y ddMes11 (rojo) forman el adaptador denominado "Lib1-Linker" (morado).

2. Obtención de la fracción metilada y fracción no metilada

Fraccionamiento del material genómico y alineamiento con adaptadores "Lib1-Linker"

A partir de 1µg de ADN genómico, con una absorbancia 260/280 \geq a 1.80, (medido con EpochTM Microplate Spectrophotometer de BioTek) se efectuó la digestión durante 6 horas a 37°C con 20U de la enzima MseI (NEW ENGLAND BioLabs inc.) adicionando 2µL de Buffer de digestión 10X (NEW ENGLAND BioLabs inc.) en un volumen final de 20µL con agua estéril. Transcurrido el tiempo se inactivó la actividad enzimática a 65°C por 20min. En un baño de hielo (4°C) se adicionó 400U de T4 DNA ligasa (NEW

ENGLAND BioLabs inc.), 1 μ L de los adaptadores específicos “Lib1-Linker” y se mantuvo por 6 horas a 16°C. Se inactivó por calor a 65°C durante 20min. Se realizó un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa con un volumen de 10 μ L de reacción para corroborar la digestión y unión a los adaptadores. Este procedimiento se realizó con cada una de las 26 muestras (Figura 16).

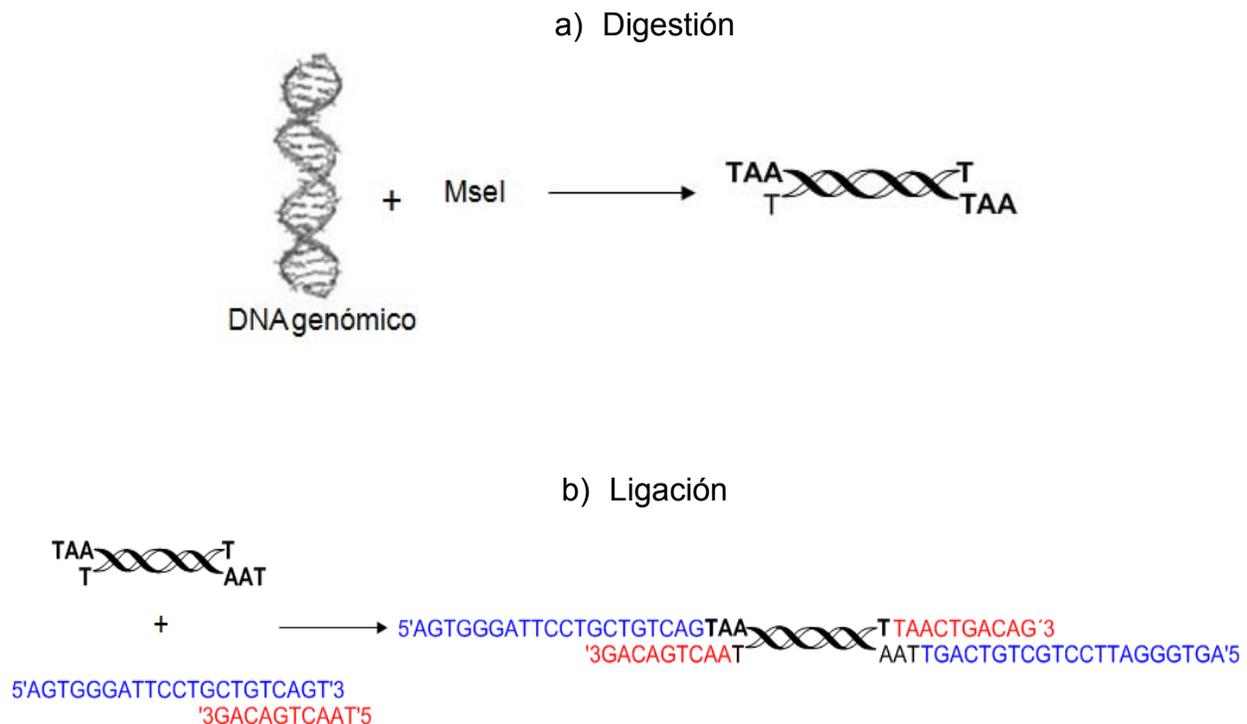


Figura 16. Digestión enzimática del ADN genómico y ligación con adaptadores “Lib1-Linker”. Digestión de ADN genómico con la enzima MseI para la posterior ligación de los fragmentos resultantes con los adaptadores “Lib1-Linker” en presencia de T4 DNA ligasa.

Preparación de la fracción metilada (FM) y fracción no metilada (FNM)

Para obtener el fraccionamiento del material genómico enriquecido con fragmentos de ADN metilado y ADN no metilado, se realizó la digestión enzimática basándose en la metodología aPRIMES⁸⁸ modificada por el Dr. Pérez Plasencia como se indica a continuación.

El volumen de reacción de cada una de las 26 muestras se dividió en 2 partes (10 μ L cada una) nombrando Fracción Metilada (FM) a la parte de la muestra que se incubó

con 20U Acil (NEW ENGLAND BioLabs inc.), 20U de HinP1I (NEW ENGLAND BioLabs inc.), 20U HpaII (NEW ENGLAND BioLabs inc.), 4µL del Buffer NEB1 10X (NEW ENGLAND BioLabs inc.), y se llevó a un volumen final de 40µL con agua estéril. La Fracción No Metilada (FNM) se incubó con 30U de la enzima McrBC (NEW ENGLAND BioLabs inc.), 2µL de Buffer NEB 2(NEW ENGLAND BioLabs inc.), 1µL de BSA 100X (NEW ENGLAND BioLabs inc.), 1µL de GTP 100X (NEW ENGLAND BioLabs inc.) y se llevó a un volumen final de 20µL con agua estéril. Ambas fracciones se incubaron a 37°C por 6 horas adicionando 1µL de cada enzima a las 4 horas. Se inactivó la actividad enzimática calentando la reacción a 65°C por 20min (Figura 17).

Se enriqueció cada fracción con reacciones de PCR. El volumen final de cada fracción (200µL) se dividió en 4 tubos de 0.6mL (50µL de reacción cada uno) con una concentración final de 0.25mM dNTP's, 2mM de Mg²⁺, 1µM de Primer "Lib1" (5' AGTGGGATTCCTGCTGTCAGT3') y 10U de DreamTaq™ DNA Polymerase (FERMENTAS). Las condiciones de la PCR fueron 72°C/3min, desnaturalización 94°C/30s, alineamiento a 62°C/30s, extensión 72°C/90s y la elongación final de 72°C/10min. Para los controles de digestión también se realizó la reacción de PCR (mismas condiciones). El producto de PCR se purificó utilizando el kit de purificación de ADN Genómico Wizard de Promega según las especificaciones del proveedor. Al final se realizó un gel de electroforesis al 1.5% de agarosa en TBE1X con 5µL de volumen de reacción de la PCR (figura 16).

Controles de digestión enzimática

Posterior a la digestión de las fracciones con el cocktail enzimático (FM) o la enzima sensible a metilación (FNM), se tomó 2µL de la fracción metilada y se incubó por 2 horas a 37°C con 1µL de la enzima McrBC, 1.33µL de Buffer NEB 2, 0.66µL BSA 100X, 0.66µL de GTP 100X y 24.35µL de agua estéril. De la misma forma se incubó por 2 horas a 37°C 2µL de la fracción no metilada con 1µL de la enzima HinP1I, 1µL de Acil, 1µL de HpaII, 2µL de Buffer 1 NEB 10X y 23µL de agua estéril (Figura 18). Al término de la segunda digestión, se llevaron a cabo reacciones de PCR para cada muestra, con las mismas condiciones de cada fracción esperando la no amplificación del producto para corroborar la correcta digestión.

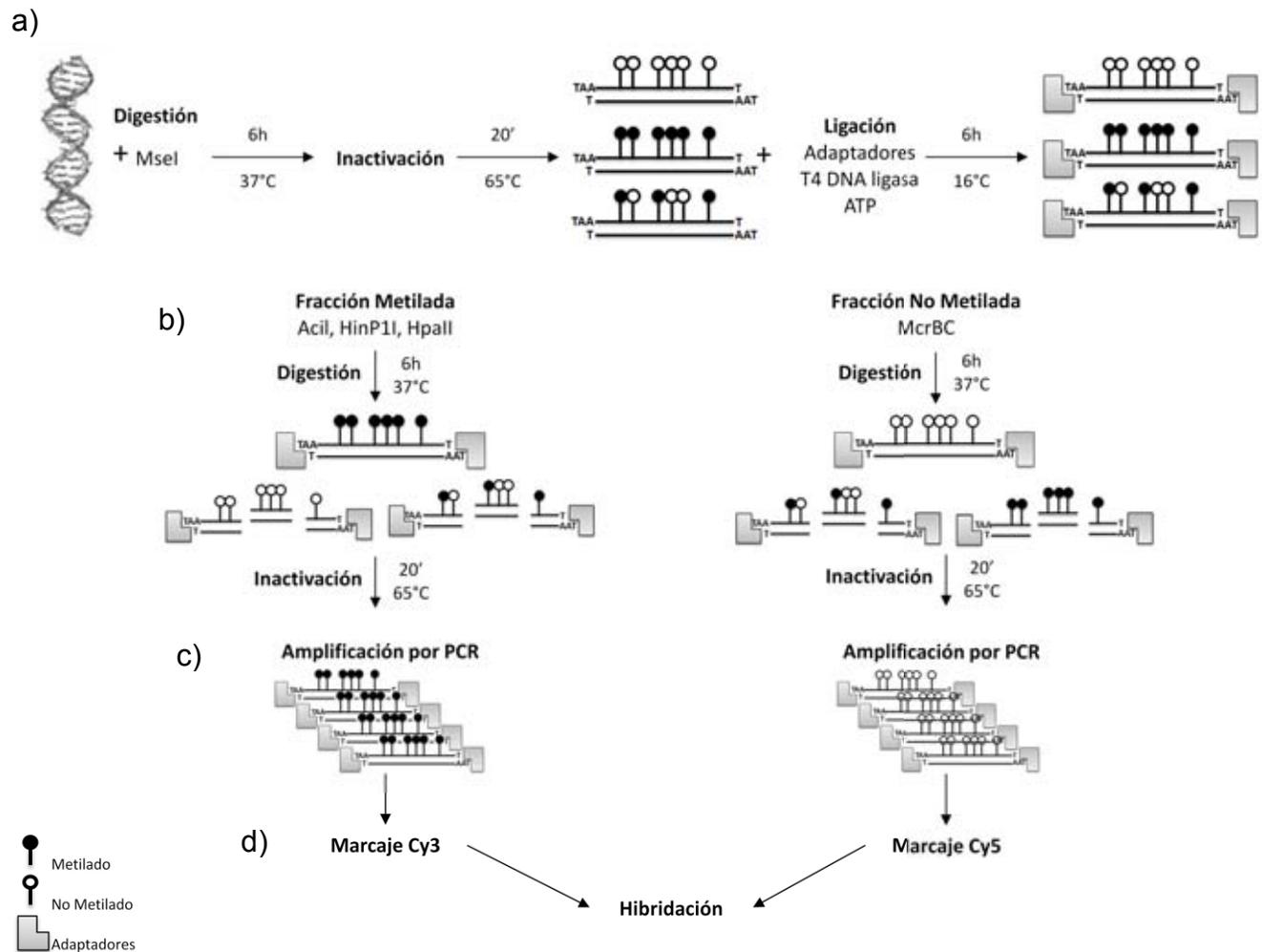


Figura 17. Metodología general de digestión, amplificación y marcaje. Representación esquemática de a) digestión del ADN genómico, b) fraccionamiento de ADN con enzimas de restricción, c) amplificación de las fracciones por PCR, d) purificación del ADN amplificado y marcaje con fluorocromos. La doble ralla (=) representa ADN de doble cadena; las cajas en gris (▭) al adaptador “Lib1-Linker”; las paletas en negras (●) ADN metilado; las paletas blancas (○) ADN no metilado.

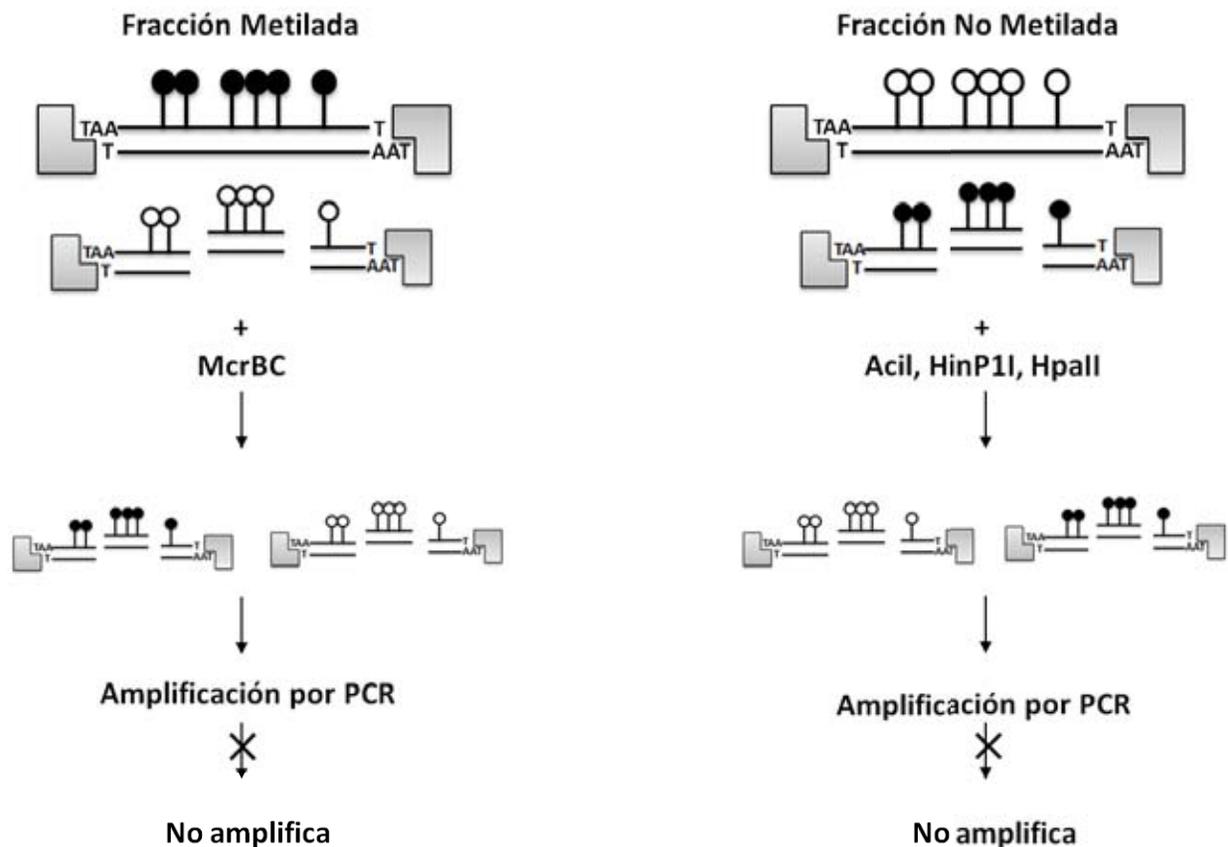


Figura 18. Controles de digestión. Representación esquemática de la metodología digestión y amplificación de controles. La doble ralla (=) representa ADN de doble cadena; las cajas en gris (▢) el adaptador “Lib1-Linker”; las paletas en negras (⬤) ADN metilado; las paletas blancas (◻) ADN no metilado.

Todas las digestiones enzimáticas y los productos de PCR se visualizaron según Sambrook⁸⁹, utilizando geles de agarosa al 1.5% (p/v) preparados en buffer TBE (Trisborato 90mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL. Las electroforesis se llevaron a cabo en cámaras de electroforesis Sub Cell (BioRad). A cada muestra se añadió buffer de carga 6X tipo IV (Sambrook), que es una mezcla de 0.25% (p/v) de azul de bromofenol y 40%(p/v) de sucrosa en agua. Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleó marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific) y empleando el fotodocumentador GelDoc-It Imager (UVP).

3. Marcaje diferencial de las fracciones con fluorocromos e hibridación sobre microarreglos

A partir de 1µg de cada una de las fracciones purificadas, se realizó el marcaje con los fluorocromos Cy3 para los fragmentos metilados (FM-Cy3) y Cy5 para los no metilados (FNM-Cy5) utilizando el kit de marcaje “NimbleGen Dual-Color DNA labeling Kits” de ROCHE y siguiendo las indicaciones de uso especificadas por el fabricante en “NimbleGen Arrays User’s Guide: Epigenetics Arrays v1.0”

Una vez realizado el marcaje, se hibridaron simultáneamente 15µg de cada fracción (15µg de FM y 15µg FNM), preparadas previamente como señala el manual “NimbleGen Arrays User’s Epigenetics Arrays – CHIP and DNA Methylation”, sobre el microarreglo 3x720K Format Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array3. Los microarreglos se incubaron a 42°C en un equipo NimbleGen Hybridization System 4 de ROCHE durante 20 horas.

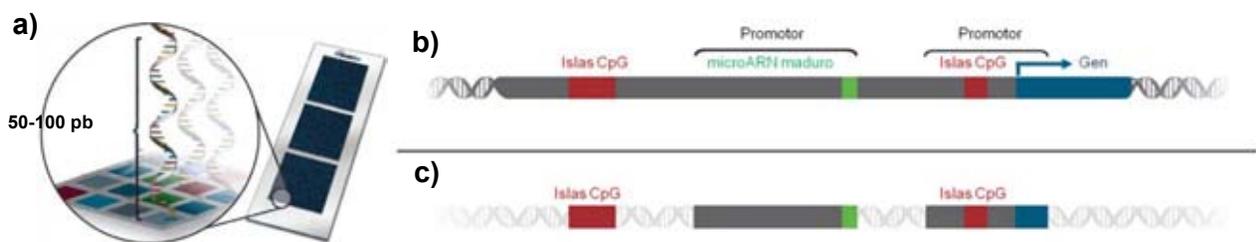


Figura 19. Diseño del microarreglo Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array3. Diseño de microarreglos. a) Colección de oligonucleótidos dispuestos en el formato químico unido a la laminilla de vidrio; b) Ejemplo de región genómica con elementos claves indicadas por diferentes colores; c) Elementos genómicos específicos cubiertos por el diseño en gris oscuro y de color, áreas genómicas de interés cubiertas por el diseño.

El arreglo está diseñado de 589 629 sondas con una longitud de 50 a 100pb, que continuas unas a otras (excepto en regiones con alta frecuencia de repetidos) cubren la totalidad de 27 728 islas CpG en de todo el genoma correspondientes a 22 532 promotores datos estas sondas están dispuestas por triplicado de manera aleatoria en todo el microarreglo (Figura 19).

Al finalizar el tiempo de hibridación, se realizó el lavado de los arreglos con los buffers I, II y III como se señala en la guía de uso “NimbleGen Arrays User’s Epigenetics Arrays – ChIP and DNA Methylation” para después ser secado por centrifugación 1min a 120rpm. Las muestras se hibridaron en el orden que se indica en la tabla 5.

Tabla 5. Registro de hibridación de muestras

CÓDIGO DE LAMINILLA	Posición		
	A01	A02	A03
532942	B22	B44	B46
533000	CN17	CN42	CN45
500511	CN72	B39	B74
532949	B21	B45	-
532968	B15	B16	B17
500645	B41	B42	B87
532975	B8	B13	B18
532961	B52	B63	B75

La combinación del código de la laminilla con la posición corresponde al código del arreglo. Cada una de las claves representa una muestra tumoral de paciente (B) y muestra libre de neoplasia (CN); No se hibridó (-).

4. Escaneo del arreglo y obtención de datos

La lectura de los arreglos se realizó con el equipo MS 200 Scanner de ROCHE según las especificaciones del fabricante y las imágenes de los canales 635(Cy5) y 532(Cy3) se extrajeron en formato jpg. El alineamiento de las imágenes y la extracción de datos de los arreglos se realizó con del software DEVA Project Manager - 1.2.1 de ROCHE, a partir del cual se obtuvieron los datos correspondientes al sitio de inicio de la transcripción, del $\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$ (Bewit normalized ratio) y el valor de la prueba estadística Kolmogórov-Smirnov (K-S Test). El estadístico K-S es una prueba no paramétrica que comúnmente se utiliza para verificar (no importando el tamaño de la muestra) si la distribución de datos se ajusta o no a una distribución normal,

comparando la frecuencia acumulada de la distribución teórica con la frecuencia acumulada observada.

Los datos solicitados son exportados por el software como un documento txt. que contiene la posición de la sonda (Chr: pares de bases inicio - pares de bases final), su valor normalizado considerando el triplicado de cada una de ellas y el valor numérico atribuido (con un total de 589 629 datos por muestra).

5. Análisis de datos de microarreglos

Análisis utilizando la herramienta Microsoft Office Access.

Para comparar el perfil de metilación entre las muestras tumorales y determinar si existe diferencias en la metilación entre los grupos de respuesta completa (RC) y enfermedad progresiva (EP), los datos correspondientes a “Bewit normalized ratio $\text{Log}_2(\text{Cy}3/\text{Cy}5)$ ” y “K-S Test” fueron exportados en formato txt y se agruparon en tablas independientes de acuerdo a la respuesta al tratamiento. Basados en la metodología de análisis propuesto por Chang y colaboradores para identificar la metilación en ZNF582⁹⁰, se estableció filtrar los datos exportados manteniendo solo aquellos que poseían un valor $\text{Log}_2(\text{Cy}3/\text{Cy}5)$ mayor a 2 y un valor en la prueba de Kolmogórov-Smirnov mayor a 2 (cumpliéndose ambas condiciones simultáneamente) por ser estos los que se encontraban hipermetilados y cumplían con la hipótesis nula (H_0) donde se afirma que la distribución observada se ajusta a una distribución normal. Para cada muestra tumoral, se ingresó en una tabla de Access (Microsoft office 2007), todos las regiones de los genes cuyos valores $\text{Log}_2(\text{Cy}3/\text{Cy}5)$ y K-S permanecieron posterior al filtro y se le ordenó al programa *mantener solo un dato* por gen (el primero que aparece que corresponde a la primera región enlistada). Posteriormente, en dos tablas independientes, se realizó un concentrado para agrupar la totalidad de genes presentes en cada tipo de respuesta (12 muestras para RC y 10 muestras EP). Como siguiente paso, se efectuó una *consulta de duplicados* para que solo se presentaran los genes que estuvieron hipermetilados en con una frecuencia mayor al 80% en los grupos (10/12 para RC y 8/10 para EP). Finalmente y posterior a este último filtro, se realizó una comparación de los genes hipermetilados en al menos el 80% de las muestras en

RC (1225 regiones) contra EP (1210 regiones). Fue de nuestro interés determinar los genes cuyas regiones promotoras estuvieron presentes en el 80% de las muestras EP (397 genes) pero no en el grupo RC (algoritmo: $[EP - (EP \cap RC)]$), (Figura 27).

Posteriormente, fueron reconocidos aquellos genes cuya frecuencia de metilación según este análisis determinó que el promotor está hipermetilado en el 100% de las muestras del grupo EP y no así en RC (37 genes). Finalmente se investigó la función de la proteína y el proceso biológico en el que se encuentra implicada (Tabla 9). De estos 37 genes se eligieron 3 para su análisis de metilación por otra técnica.

Análisis utilizando el lenguaje de programación R

Con este segundo método de análisis se evaluó la diferencia de metilación entre los grupos de muestras tumorales (22 muestras) y las de epitelio normal cervical (4 muestras). Consecutivamente se analizó el perfil de metilación de las muestra del grupo RC y se comparó contra el del grupo EP.

Comparación de metilación entre muestras tumorales y normales cervicales.

Inicialmente se obtuvieron los valores de metilación $\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$ correspondientes al sitio de inicio de la transcripción de cada arreglo (26 arreglos totales) y se exportaron en formato txt. Posteriormente se clasificaron y se reagruparon los datos en tablas independientes según pertenecía a muestras de epitelio libre de displasia o cáncer localmente avanzado. De la totalidad de los datos obtenidos $\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$ se obtuvo el valor promedio de la señal de metilación de las sondas que representan a cada uno de los genes para cada una de las muestras, dando como resultado 27 728 datos por muestra que constituyen la metilación promedio del promotor de cada gen considerado en el diseño del arreglo (Figura 19). Posteriormente se analizaron los datos para determinar si existe una diferencia significativa de metilación entre los grupos Cáncer vs Normal para lo cual se hizo uso de la estadística inferencial. Se empleó la prueba paramétrica t de Student comparando la media de metilación de cada gen entre grupos de análisis y considerando un nivel de significancia (p) menor o igual a 0.005 (usualmente utilizado y aceptado en análisis de procesos biológicos). Genes cuya comparación arrojó un valor de $p \leq 0.005$ se considera que están diferencialmente

metilados significativamente (tanto hipometilados e hipermetilados). Para representar el comportamiento en la metilación de estos genes dentro de los grupos de análisis, se realizó un análisis comparativo no supervisado con el que se trazó el mapa de calor (Figura 39) y la grafica de volcán (Figura 40). Todos los análisis y gráficos se calcularon mediante el paquete estadístico R (R versión 2.11.1).

Comparación de metilación entre el grupo de respuesta completa y enfermedad progresiva.

Una vez obtenidos los valores de metilación $Log_2(Cy3/Cy5)$ correspondientes al sitio de inicio de la transcripción de cada arreglo (22 arreglos en total), se clasificaron según el tipo de respuesta al tratamiento convencional que presentó el paciente del que provenía la muestra (RC =12 y EP=10). Al igual que en la comparación de cáncer vs normal, de la totalidad de los datos obtenidos $Log_2(Cy3/Cy5)$ se obtuvo el valor promedio de la señal de metilación de las sondas que representan a cada uno de los genes para cada una de las muestras, obteniendo como resultado 27 728 datos por muestra que representan la metilación promedio del promotor de cada gen considerado en el arreglo. Se comparó la media de metilación de cada gen entre los grupos RC vs EP para determinó si existe diferencia significativa entre ambos grupos a través de la prueba de estadística inferencial t de Student. De este análisis se obtuvo una serie de genes diferencialmente metilados con un nivel de significancia $p \leq 0.005$, cuyo comportamiento de hipometilación e hipermetilación se encuentra representado en el mapa de calor (Figura 44) y el gráfico del volcán (Figura 45) a través de un análisis comparativo no supervisado. Todos los análisis y gráficos se calcularon mediante el paquete estadístico R (R versión 2.11.1).

6. Validación de resultados por MSP

De un primer análisis (Microsoft Office Access) se eligieron 3 genes que, según los resultados, presentaron una hipermetilación en la región promotora con una frecuencia del 100% en la muestra del grupo EP y no así en RC. La metilación de su región promotora se analizó por Metilación específica por PCR (MSP).

Diseño de Oligonucleótidos para el análisis de metilación por MSP

Como primer paso se realizó una búsqueda en UCSC Genome Browser⁹¹ para determinar la ubicación correspondiente a la región promotora de cada uno de los genes a validar por MSP. Posteriormente se extrajo el archivo FASTA correspondiente a la secuencia de nucleótidos 5'→3' de la región promotora de cada gen añadiendo 200 bases río arriba y 200 río abajo. Posteriormente el archivo FASTA se cargó en el programa en línea MethPrimer: designing primers for methylation PCRs⁹² asignando los parámetros de diseño de oligos para MSP; tamaño del producto óptimo 200, mínimo 100 y máximo 300; temperatura de alineación óptima 55°C, mínima 50°C y máxima 60°C. Al finalizar, el programa diseña dos pares de oligos: un par que es complementario a regiones metiladas que han sido tratadas previamente con bisulfito de sodio y un segundo par de oligos que es complementario a regiones no metiladas que han sido modificadas previamente con bisulfito de sodio.

Modificación con bisulfito de sodio

Para la modificación del ADN se utilizó el Kit EZ DNA MethylationTM de (ZYMO RESEARCH). 500ng de ADN de cada muestra se mezclaron (de manera individual) por pipeteo con 5µL de *M-Dilution Buffer* en un volumen final de 50µL llevados con agua estéril. Posteriormente se incubó la reacción a 37°C por 15 minutos para después adicionar 100µL de *CT Conversion Reagent* (preparado previamente como indica las especificaciones). La mezcla de reacción se incubó por 16 horas a 50°C (en ausencia de la luz) y la reacción se paró al incubarla a 4°C por 10 minutos. Se prosiguió con la desulfonación y purificación del material genético modificado según las indicaciones del fabricante contenidas en el protocolo. Para comprobar la eficiente modificación con bisulfito se utilizó el Universal Methylated DNA Standard de (ZYMO RESEARCH) el cual fue modificado a la par de las muestras y posterior PCR según las indicaciones señaladas por el fabricante (Figura 20).

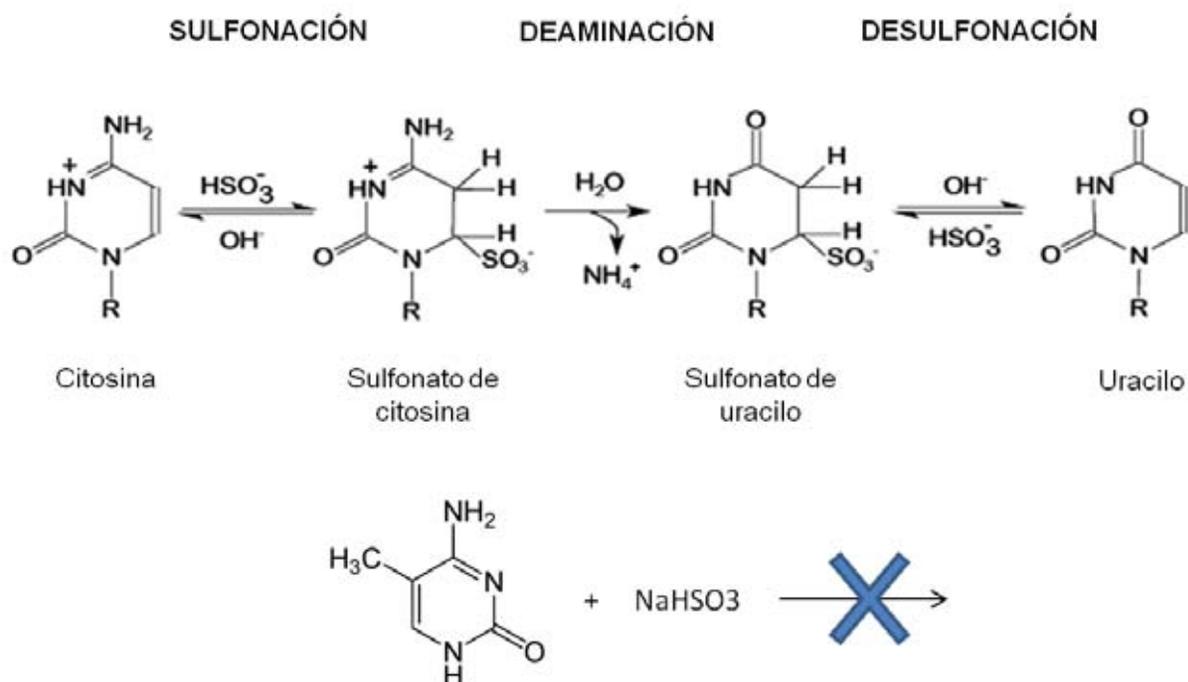


Figura 20. Modificación del ADN por bisulfito de sodio. Mecanismo de reacción del ataque nucleofílico SN1 mediante el cual el bisulfato de sodio intercambia la citosina no metilada en uracilo

Análisis de metilación por MSP

Para evaluar la metilación por MSP de los tres genes elegidos en el primer análisis (MFSD6, PAPSS2 Y ZCCHC13) se escogieron aleatoriamente 5 muestras pertenecientes al grupo RC, 5 muestras del grupo EP y 3 de epitelio normal de cérvix que previamente fueron modificadas con bisulfito de sodio como se mencionó anteriormente.

Realizada la modificación del ADN, se evaluó el estado de metilación de la región promotora de los tres genes en cada una de las 13 muestras a través de reacciones de PCR con los oligonucleótidos complementarios a ADN metilado (M) y los oligonucleótidos complementarios a ADN no metilado (U).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ L con una concentración final de: Mg²⁺ de 2-2.5mM, dNTP's 0.25 μ M c/u, 0.6 μ M oligonucleótido c/u y 1U de DNA polimerasa. La PCR se realizó con 1 ciclo de 95 ° C durante 5 min, 33

ciclos de 95 ° C durante 20s, la alineación a la temperatura indicada durante 20s y 72 °C durante 30s, seguido de 1 ciclo de 72 °C durante 5 min. Las reacciones de PCR se amplificaron en el equipo Eppendorff Master Cycle1 personal y en gradiente el Thermo scientific Arktik Thermal Cyclers (tabla 6, Figura 21).

Tabla 6. Condiciones de la PCR para el análisis de metilación por MSP

Gen		Temperatura de alineación (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
MSFD6	M	49	110
	U	57	112
PAPSS2	M	59	148
	U	55	146
ZCCHC13	M	59	110
	U	52	112

(M) Metilado; (U) No metilado

Los productos de PCR se visualizaron según Sambrook⁸⁹, utilizando geles de agarosa al 2% (p/v) preparados en buffer TBE (Tris-borato 90mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL. Las electroforesis se llevaron a cabo en cámaras de electroforesis Sub Cell (BioRad). A cada muestra se añadió buffer de carga 6X tipo IV (Sambrook). Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleó marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (ThermoScientific) y empleando el fotodocumentador GelDoc-It Imager (UVP).

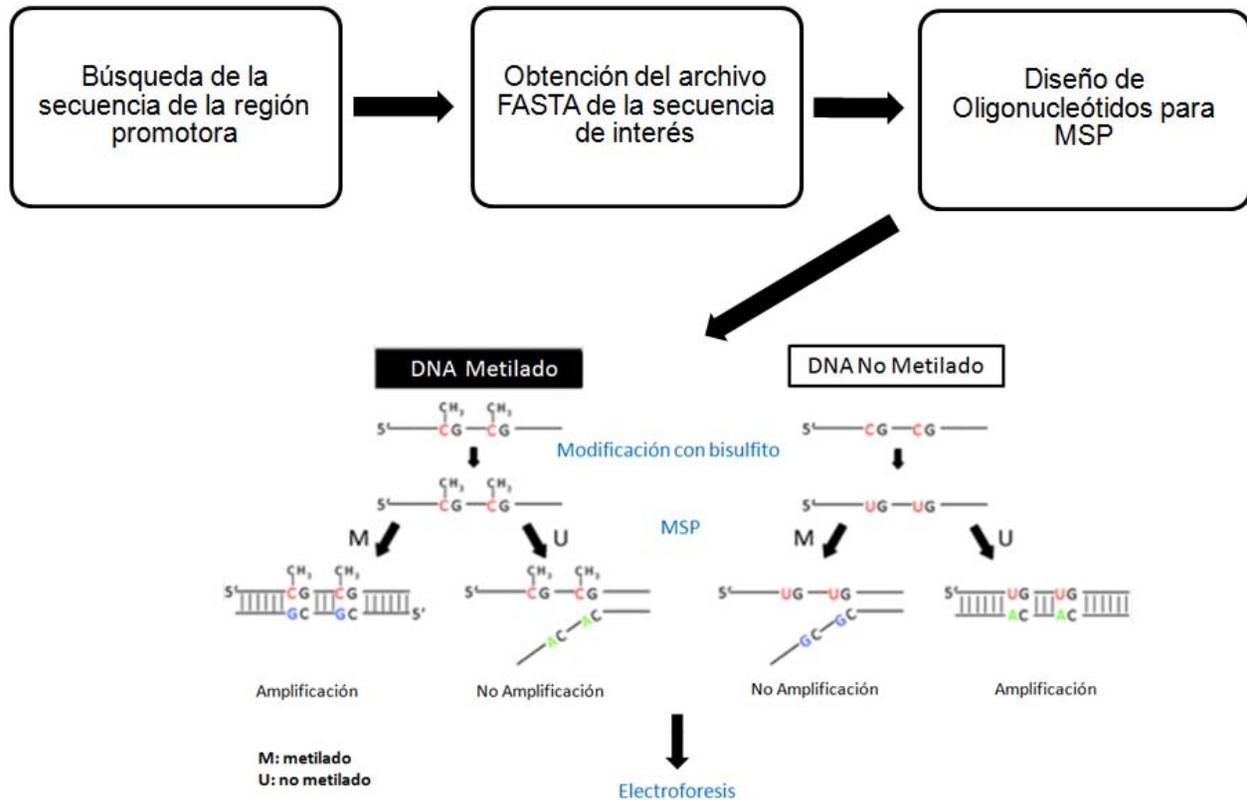


Figura 21. Metodología para el análisis de metilación por MSP. Metodología empleada para la validación de resultados. Comprende el diseño de oligos que reconocen regiones metiladas o no metiladas, modificación del ADN con bisulfito de sodio y amplificación del ADN modificado por PCR.

RESULTADOS

Características y clasificación de las muestras

Para la realización de este estudio, las muestras obtenidas se clasificaron en 2 grupos de acuerdo a la respuesta al tratamiento convencional (quimioterapia con platino y radioterapia concomitante) que presentaron las pacientes de las que provenían (Tabla7).

Tabla 7. Caracterización de las muestras incluidas en este estudio y tipo de respuesta posterior al tratamiento.

Clave Muestra	Edad	Tipo histológico	Estadio clínico (FIGO)	Respuesta
B46	63	Epidermoide	IIB	Completa
B41	54	Epidermoide	IIB	Completa
B40	60	Epidermoide	IIB	Completa
B39	29	Epidermoide	IIB	Completa
B22	57	Epidermoide	IIIB	Completa
B15	43	Epidermoide	IIB	Completa
B44	62	Epidermoide	IIB	Completa
B19	35	Epidermoide	IB2	Completa
B87	38	Epidermoide	IIIB	Completa
B63	43	Epidermoide	IIIB	Completa
B45	46	Epidermoide	IIB	Completa
B75	57	Epidermoide	IIB	Completa
B6	49	Adenocarcinoma	IIB	Progresión
B21	48	Epidermoide	IIIB	Progresión
B74	41	Epidermoide	IIB	Progresión
B42*	36	Epidermoide	IIIB	Progresión
B52	50	Epidermoide	IIIB	Progresión
B17*	44	Epidermoide	IIB	Progresión
B16*	32	Epidermoide	IIB	Progresión
B18*	51	Epidermoide	IIIB	Progresión
B8*	47	Epidermoide	IIB	Progresión
B13*	31	Epidermoide	IIB	Progresión
CN42	-	-	-	Normal
CN17	-	-	-	Normal
CN52	-	-	-	Normal
CN72	-	-	-	Normal

La clave (B) representa muestra tumoral; (CN) epitelio cervical libre de displasia o "normal"; (*) Fallecida.

Respuesta completa ó RC: Si posterior al tratamiento convencional, el paciente no presenta una recurrencia de la enfermedad.

Enfermedad Progresiva ó EP: Si a pesar del tratamiento, el paciente presenta una recurrencia de la enfermedad, metástasis y/o fallece.

Fue posible la clasificación de las muestras al realizar una revisión de las notas e informes médicos ingresados en INCaNet.

1. Diseño y alineamiento de los adaptadores específicos

Una vez resuspendidos los oligos Lib1 y ddMes11 a la concentración de trabajo, se realizó el alineamiento de los adaptadores como se especifica en la metodología y se corrió un gel de electroforesis de agarosa (Figura 22) para determinar si se efectuó la alienación para síntesis de los adaptadores específicos “Lib1-Linker”

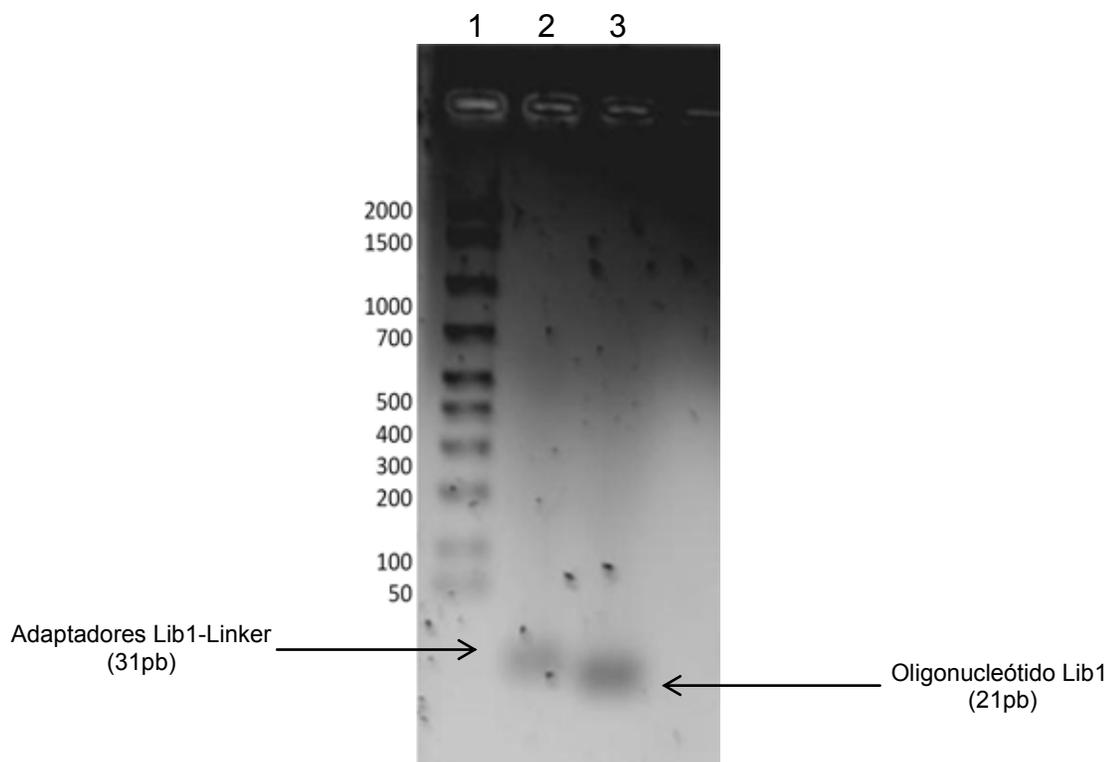


Figura 22. Alineación de los oligos Lib1 y ddMse11 para la síntesis de los adaptadores específicos “Lib1-Linker”. 1) Marcador de peso molecular 50-2000pb, 2) Adaptadores específicos “Lib1-Linker” (31pb), 3) Oligonucleótido Lib1 (21pb). Por el patrón observado en el gel, se comprueba la correcta alienación de los adaptadores.

En la figura 22 se observa la comprobación de la alineación de los oligonucleótidos que conforman los adaptadores específicos “Lib1-Linker” (Lib1 de 21pb + ddMse11 de 10pb), el cual al tener un tamaño de 31 pb presentando un menor frente de corrida con respecto al oligonucleótido Lib1 de 21pb.

2. Obtención de la fracción metilada (FM) y fracción no metilada (FNM).

Después de la digestión del ADN genómico de cada muestra con la enzima MseI, se efectuó el gel de electroforesis esperando observar el barrido y se realizó la ligación de los fragmentos obtenidos con los adaptadores (Lib1-Linker) previamente alineados (Figura 23).

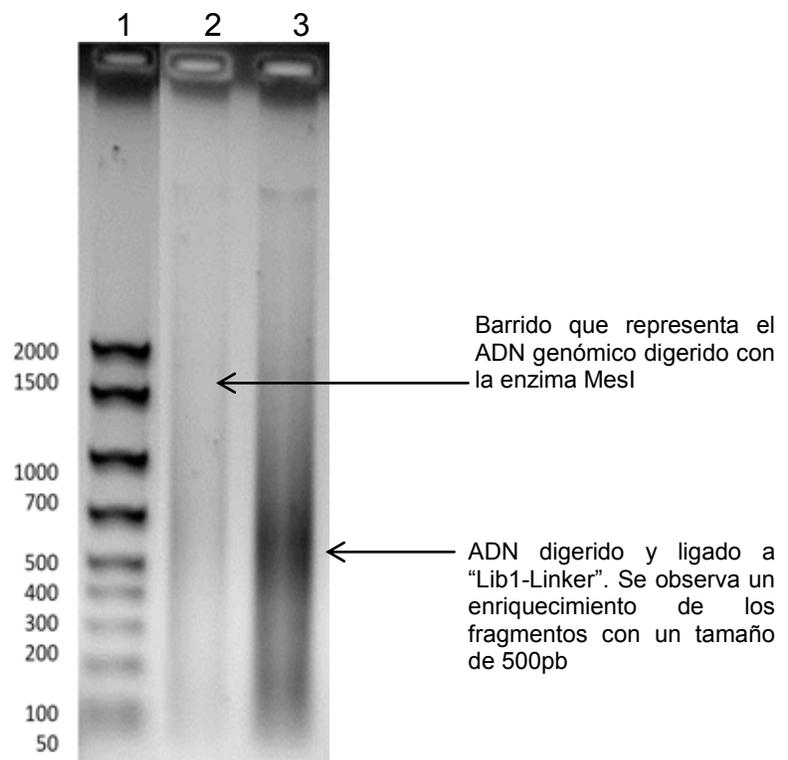


Figura 23. Digestión de ADN genómico y ligación con los adaptadores específicos “Lib1-Linker”. Ejemplo de digestión del ADN genómico de la muestra B63 con la enzima MseI y la posterior ligación de los fragmentos resultantes a los adaptadores específicos “Lib1-Linker”. 1) Marcador de peso molecular 50-2000pb; 2) ADN genómico digerido con la enzima MseI; 3) ADN genómico ligado a los adaptadores específicos “Lib1-Linker” posterior a su digestión.

En la digestión del ADN genómico, la enzima restricción tipo II MseI reconoce la secuencia palindrómica 5'...T[~]TAA...3' realizando el corte en el sitio señalado. Esta secuencia está distribuida en todo el genoma humano por lo que se generan fragmentos de distintos tamaños que se observan como un barrido en la Figura 23-2. Con mayor frecuencia se presenta el fragmento de 500pb, tamaño que presenta un enriquecimiento en la Figura 23-3 correspondiente a los fragmentos unidos a los adaptadores específicos.

De manera independiente cada una de las 26 muestras se fraccionó utilizando el coctel enzimático o la enzima de restricción McrBC para obtener fragmentos metilados o no metilados como se indica en el capítulo de metodología. Posteriormente, cada fracción fue enriquecida a través de reacciones de PCR cuya amplificación del producto se puso en evidencia en el gel de electroforesis. En la siguiente imagen también se muestra el resultado obtenido al amplificar por PCR los controles de digestión (Figura 24).

Para la fracción metilada (con fragmentos de ADN metilado), el DNA se incubó con enzimas de restricción como se indica en metodología. Acil es una enzima cuyo gen se encuentra en *Arthrobacter citreus* y que reconoce secuencias palindrómicas 5'...C[~]CGC...3' pero su funcionamiento se ve bloqueado en secuencias CG metiladas. Por otra parte, la enzima HinP1I es obtenida del gen de *Haemophilus influenzae*, reconoce secuencias palindrómicas 5'...G[~]CGC...3' cortando en el sitio señalado aunque su funcionamiento es bloqueado con CG metiladas. Una tercer enzima es la HpaII de *Haemophilus parainfluenzae* que reconoce y corta secuencias palindrómicas en 5'...C[~]CGG...3' y se bloquea su actividad con CG metiladas. En su conjunto, estas tres enzimas de restricción tipo II conforman el coctel enzimático con el que se asegura la digestión de los fragmentos que no poseen metilación en citosinas formando así la fracción metilada. Para la fracción no metilada (con fragmentos de ADN no metilado) la enzima de restricción tipo IV (corta ADN metilado en una secuencia específica) McrBC reconoce y corta secuencias Pu^mCG por lo que quedan íntegros los fragmentos que no se encuentran metilados. Para garantizar que cada fracción tuviera tan solo los fragmentos deseados, se realizaron los controles de digestión que consistieron en una segunda digestión de las fracciones utilizando el grupo de enzimas contrarias a la

primera digestión. Solo los fragmentos de ADN que no han sido digeridos por las enzimas durante el fraccionamiento de las muestras, son los que amplificaron durante las reacciones de PCR. Dentro de la secuencia de los adaptadores específicos que flanquean por ambos extremos los fragmentos de ADN resultado de la digestión con la enzima MseI, poseen la secuencia de reconocimiento para el oligonucleótido que se utiliza como cebador “Lib1-Primer” durante la PCR. Los productos de reacción se observan en la figura 24. La FM y FNM amplifican tamaños de 400-700pb principalmente (Figura 24,-2 y 24-4), no así los controles donde no se logra amplificación visible (Figura 24-3 y 24-5) garantizando la correcta digestión por las enzimas de restricción.

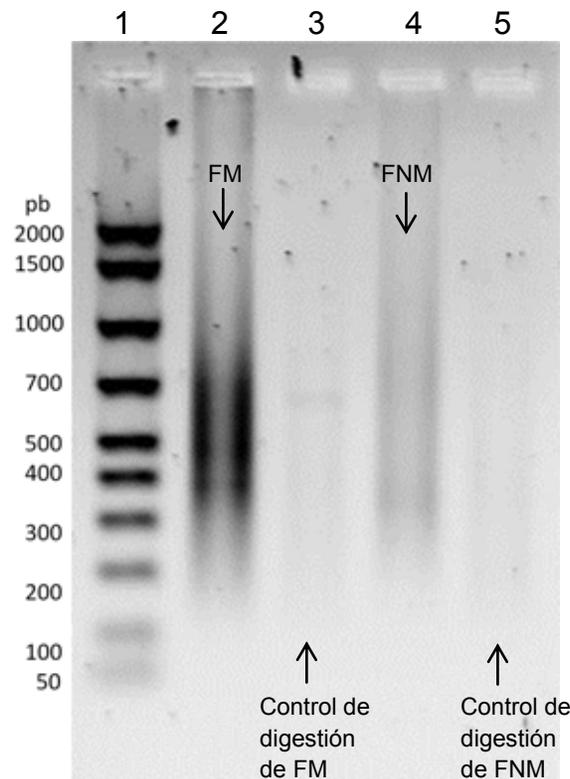


Figura 24. Amplificación de la fracción genómica metilada y no metilada en comparación con los controles de digestión. Ejemplo de amplificación por PCR de la fracción metilada (FM), no metilada (FNM) y controles de digestión para la muestra B63. 1) Marcador de peso molecular 50-2000pb; 2) FM de B63 (digestión con las enzimas Acil, HinP1I y HpaII); 3) control de digestión de la FM de B63 (digestión de FM con McrBC); 4) FNM de la muestra B63 (digestión con la enzima McrBC); 5) Control de la FNM de la muestra B63 (digestión de FNM con las enzimas Acil, HinP1I y HpaII).

3. Marcaje diferencial de las fracciones metiladas y no metiladas con fluorocromos

Se realizó el marcaje de las fracciones metiladas (FM-Cy3) y no metiladas (FM-Cy5) como se indica en metodología. Posteriormente se cuantificó el ADN purificado y la incorporación de los fluorocromos (Tabla 8).

Tabla 8. Marcaje diferencial con fluorocromos de la Fracción Metilada-Cy3 y la Fracción No Metilada-Cy5.

Muestra	FM (µg)	FNM (µg)	Incorporación de Cy's ≥200pmol
B46	15.8	17.625	✓
B41	17.135	16.255	✓
B40	18.615	16.255	✓
B39	15.565	14.005	✓
B22	12.260	15.630	✓
B15	14.26	16.795	✓
B44	12.521	13.700	✓
B19	16.482	15.946	✓
B87	18.493	16.709	✓
B63	9.780	9.975	✓
B45	13.565	12.705	✓
B75	18.306	17.581	✓
B6	17.866	18.572	✓
B21	14.800	14.835	✓
B74	12.580	15.840	✓
B42	14.670	12.850	✓
B52	16.110	13.850	✓
B17	16.015	15.415	✓
B16	14.833	14.060	✓
B18	17.649	15.473	✓
B8	13.690	15.352	✓
B13	17.693	14.953	✓
CN42	12.027	11.822	✓
CN17	11.688	13.788	✓
CN52	13.681	11.039	✓
CN72	12.009	12.730	✓

La clave (B) representa muestras tumorales; (CN) muestras de epitelio normal de cérvix libre de displasia; (FM) Fracción metilada; (FNM) Fracción no metilada.

Para el marcaje diferencial de las fracciones se utilizó el kit “NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kits” de ROCHE, que consiste en oligonucleótidos al azar marcados con los fluorocromos Cy3 o Cy5. Los fluorocromos son compuestos químicos con la particularidad de que absorben luz a una longitud de onda y emiten a otra diferente. Para enriquecer los fragmentos marcados, se utiliza Exo⁺Klenow que es una ADN polimerasa I derivada de *E. coli* que carece de actividad de exonucleasa (enzimas que catalizan una reacción de hidrólisis que rompe los enlaces fosfodiéster) 5'→3' y 3'→5'.

4. Hibridación, escaneo y obtención de los datos de microarreglos

Se hibridaron simultáneamente FM y FNM de cada muestra sobre las sondas de microarreglos. La información obtenida por los canales 635nm (Cy5) y 532nm (Cy3) se codifica como una imagen con spots de tres distintos colores (Figura 25).

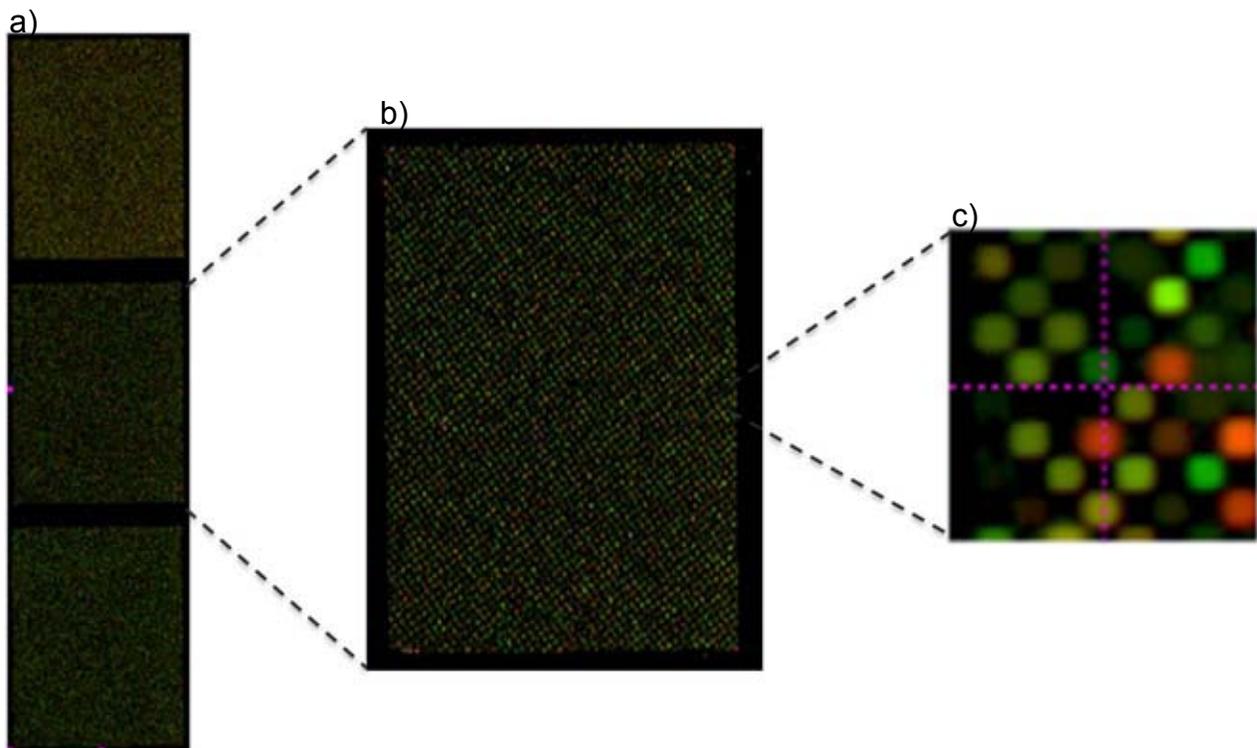


Figura 25. Hibridación sobre sondas de microarreglos. Ejemplo de imagen de arreglos hibridados obtenida por el equipo MS 200 Scanner y el software DEVA. a) 3x720K Format Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array3; b) Hibridación del arreglo 532968A02; c) aumento de la señal del microarreglo 532968A02. Los spots en verde representan FM-Cy3, los spots en rojo FNM-Cy5, los spots en amarillo corresponden a ADN hemimetilado.

Debido a que ambas fracciones (FM y FNM de cada muestra) son hibridadas en cantidades iguales sobre las sondas de microarreglos, estas compiten por la región de complementariedad, siendo aquellos fragmentos que estén más abundantes los que tienen mayor probabilidad de hibridar con las sondas del arreglo. Posterior al alineamiento y escaneo de las imágenes de los arreglos por el software DEVA, es posible observar los spots correspondientes a cada sonda con tres tipos de señales: verde para la hibridación con FM-Cy3; rojo, cuando la FNM-Cy5 fue la que hibridó con la sonda y amarillo cuando ambas fracciones hibridaron en la misma proporción con la sonda (Figura 25). Esta última señal puede deberse a la diploidia de los genes y/o heterogeneidad del tejido de la muestra tumoral de la que se extrajo el ADN considerando que se conforma de células neoplásicas con distintos grados de desdiferenciación celular y por tanto con distintos grados de metilación. Se obtuvo la información de metilación de cada una de las sondas del arreglo. Es importante mencionar que según el diseño, las sondas se encuentran por triplicado localizadas de manera aleatoria en la matriz, obteniendo un promedio de la señal por sonda y después normalizando el valor con el algoritmo ($\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$).

A partir del alineamiento y análisis de las imágenes de los arreglos con el software DEVA, se extrajeron para cada muestra, 589 629 datos normalizados $\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$ que corresponden al valor promedio del triplicado de cada una de las sondas que cubren a 27 728 islas CpG que se encuentran dentro de 22 532 promotores.

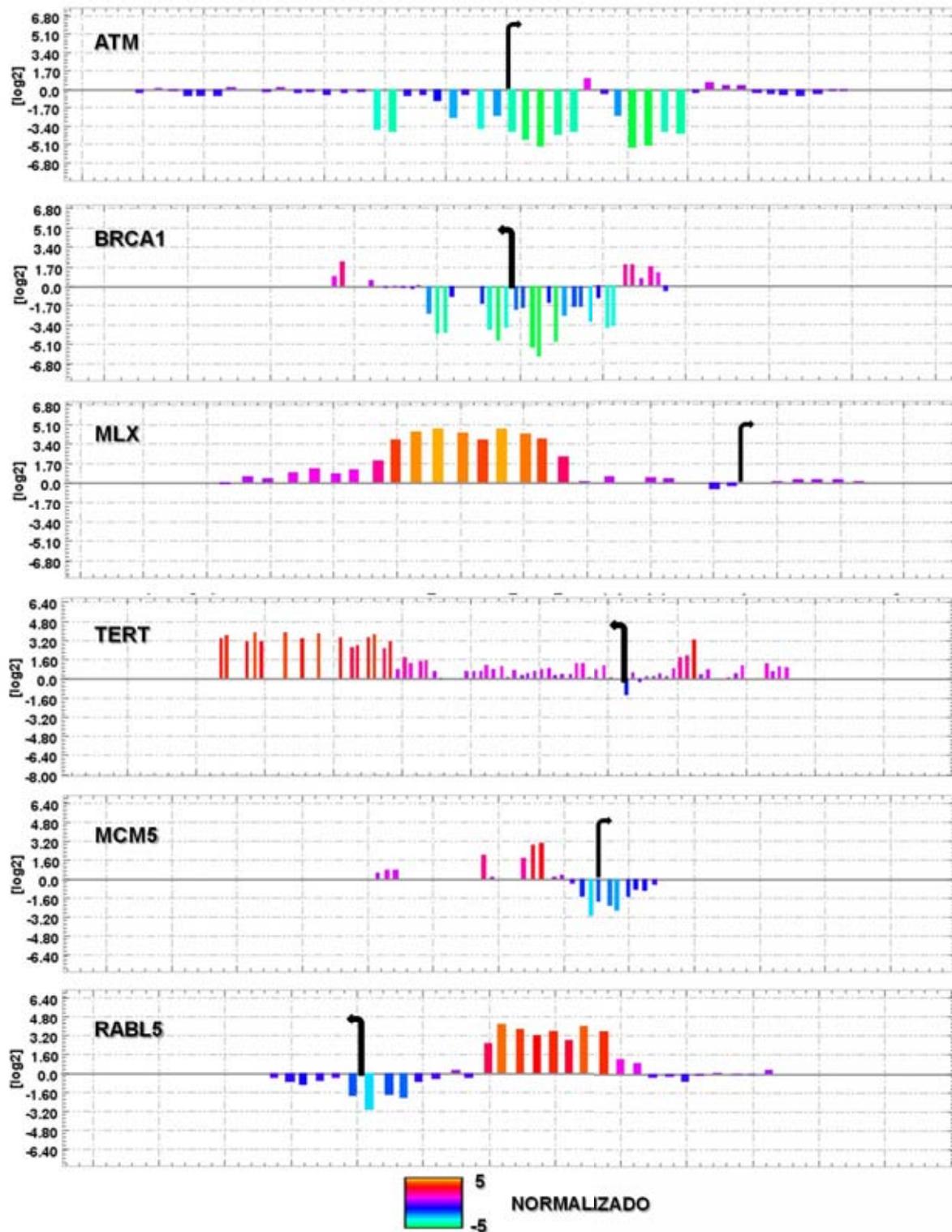


Figura 26. Perfil de metilación en la región promotora de ATM, BRCA1, MLX, TERT, MCM5 y RABL5 en muestras tumorales. Cada una de las barras corresponde al valor de metilación de una sonda. Los valores positivos determinan la presencia de metilación y valores negativos la ausencia de metilación. La gama de color especifica el valor numérico normalizado del Log2 (Cy3/Cy5). El número de barras varía según la longitud de la Isla CpG. La flecha negra indica el sitio de inicio de la transcripción.

A causa de que el marcaje de la fracción metilada fue con Cy3 y el de la fracción no metilada con Cy5, el valor resultante de la normalización ($\text{Log}_2(Cy3/Cy5)$) se considero positivo para una señal de hipermetilación (Figura 26 barras hacia arriba) y negativo para la que correspondía a hipometilación (Figura 26 barras hacia abajo). Estas señales, según el diseño del arreglo (Figura 19) comprenden regiones ricas en CpG que generalmente se encontraron en sitios promotores de genes y que podían abarcar, sitios de inicio de la transcripción más allá del primer intrón, primer exón o 2000pb aproximadamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En la figura 26 se observan ejemplos de diferentes patrones de metilación a lo largo de regiones enriquecidas con islas CpG. Cada barra representa el comportamiento de metilación evaluado por la sonda, dispuestas una adyacente a otra y tantas como sea la dimensión de la región promotora, la cual es variable según el gen, garantizando la completa evaluación de metilación de regiones de interés para este estudio. Con respecto a los resultados, se puede observar distintos comportamientos de metilación a lo largo de la región promotora; en la figura 26 existe un comportamiento de hipometilación para el gen ATM y BRCA1 pues el grafico DEVA muestra valores por debajo de cero; en la misma figura, para el gen MLX y TERT se encuentran metiladas por mostrar valores positivos, pero en MCM5 y RABL5 la metilación varía a lo largo de la región evaluada presentando ambos comportamientos haciendo evidente la variación que puede presentarse a lo largo de un promotor.

5. ANALISIS DE DATOS DE MICROARREGLOS

5.1 Análisis realizado con la herramienta Microsoft Office Access.

En este análisis se determinó que en el grupo EP existen 1210 genes cuyo valor promedio de metilación de su región promotora indicó estar hipermetilados en al menos 80% de las muestras (8/10). Para el grupo RC, el número de genes con promotores hipermetilados en al menos 80% (10/12) de los pacientes fue de 1225. De la totalidad de esos genes, el diagrama de Van Euler demostró que existieron 813 genes cuyos promotores están hipermetilados en ambos grupos y de estos, tan solo 397 son los que su región promotora se encuentra hipermetilada en el grupo EP (Figura 27).

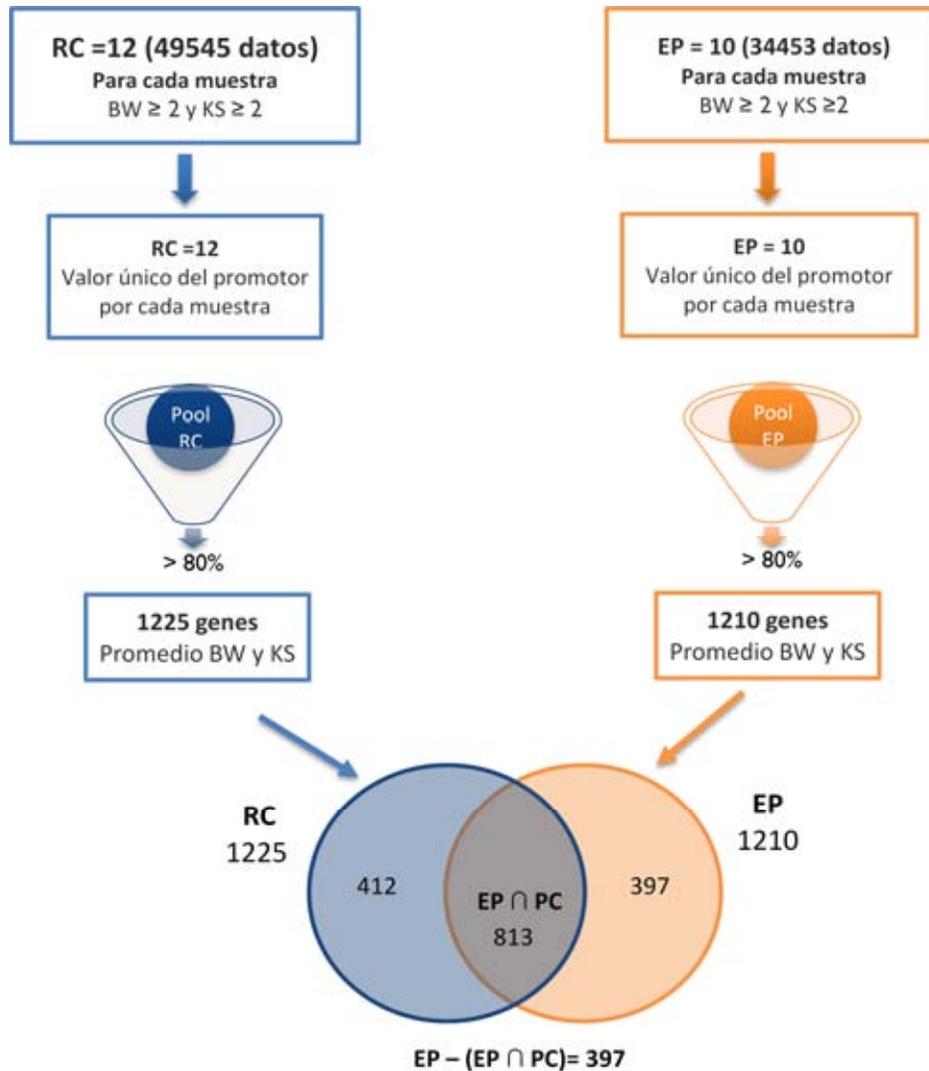


Figura 27. Metodología de análisis de los datos de hipermetilación de muestras tumorales empleando microsoft office access. En azul se representa al grupo de respuesta completa (RC) y en anaranjado al grupo de enfermedad progresiva (EP). 813 genes presentan sus promotores hipermetilados tanto en EP como RC; 412 promotores hipermetilados de genes en RC que no se comparten con EP y el grupo EP presentan 397 promotores hipermetilados que no se comparten con RC. Valor normalizado de metilación (BW); prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS).

Se encontraron 397 genes cuyos promotores están hipermetilados en el 80% de las muestras que pertenecen al grupo EP y que no se comparte con los de RC. De estos 37, resultaron estar hipermetilados en el 100% de las muestras EP, según nuestro análisis y a continuación se describe la función principal de su proteína (Tabla 9).

Tabla 9. Genes con promotores hipermetilados en todas las muestras del grupo EP

<i>Nombre</i>	<i>Sinónimo</i>	<i>Promedio Log2(Cy3/Cy5)</i>	<i>Promedio KS-test</i>	<i>Función de la proteína</i>
C14orf64	-	2.38507	3.87052	-
APTX	AOA	2.81048	3.89326	Proteína implicada en la reparación del ADN.
TMPRSS3	DFNB10	2.69207	3.38249	Serinproteasa. Su mal funcionamiento está asociado con algunos tipos de cáncer. Involucrados en metástasis y activación de hormonas u otros factores de crecimiento en células cancerosas.
EXOC3L2	FLJ36147	3.59351	4.06699	Necesaria para la adecuada señalización de VEGFR-2 en células endoteliales.
TMED10P1	TMED10P	2.77319	3.76937	-
ELF5	ESE2	2.59423	3.34032	Implicada en la regulación y diferenciación de queratinocitos. Regula genes específicos de epitelio glandular, como la glándula salival y de próstata.
LIPE	HSL	3.35224	3.96469	En tejido adiposo y corazón hidroliza los ácidos grasos libres. En otros tejidos transforma esteroides de colesterol en colesterol libre para la producción de hormonas esteroidales.
LOC646471	-	2.41647	4.48953	-
LOC729234	-	2.97868	2.59077	Dominio fumarilacetoacetato hidrolasa que contiene 2 pseudogenes.
SPTBN5	BSPECV	3.30809	2.49188	Espectrina, proteína del eritrocito.
MFSD6	FLJ20160	2.6266	3.372	-
APOLD1	DKFZp434 F0318	2.65974	2.79934	Proteína de células endoteliales que participa en la regulación de la señalización y función vascular. Involucrada en la angiogénesis.
CYTSB	FLJ36955	2.57118	3.05873	-
BCKDHA	BCKDE1A	2.82211	3.85741	Enzima mitocondrial que cataliza el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada. Cataliza la conversión general de alfa-ceto ácido a acil-CoA y CO.
OAZ2	AZ2	2.71383	2.67894	Cataliza la síntesis de ornitina a putrescina en la biosíntesis de poliamina.
SERPINB9	CAP-3	2.3448	2.93827	Enzima involucrada en la coagulación, fibrinólisis, fijación de complemento, remodelación de matriz y apoptosis. La sobreexpresión de esta proteína puede evitar que los linfocitos T citotóxicos eliminen ciertas células tumorales
PAPSS2	ATPSK2	2.53159	5.10204	Importante en la esquelotogénesis durante el desarrollo postnatal. Defectos en este gen causan displasia espondiloepimetáfisaria de tipo Pakistaní.
PGC	FLJ99563	2.9717	3.30421	Enzima digestiva que componente de la mucosa gástrica que hidroliza una variedad de proteínas. Polimorfismos de este gen están asociados a cáncer gástrico.
C2orf70	-	2.64053	4.01628	-
C7orf53	FLJ39575	2.41882	4.45546	Proteína transmembranal.

Continuación tabla 9

<i>Nombre</i>	<i>Sinónimo</i>	<i>Promedio Log2(Cy3/Cy5)</i>	<i>Promedio KS-test</i>	<i>Función de la proteína</i>
CAPN14	FLJ54788	2.55644	3.15931	Cisteín proteasas involucradas en apoptosis, división celular, interacción de integrinas-citoesqueleto y plasticidad sináptica.
CEP170L	FAM68B	3.08332	3.38979	Proteína centrosomal de 170kDa.
CELA3B	CBPP	2.99149	3.30447	Quimotripsina 3B elastasa secretada como zimógeno por el páncreas. Participa en el transporte intestinal y el metabolismo del colesterol.
RAB27A	GS2	2.35253	3.58902	Pertenece a la familia Rab de las GTPasas pequeñas. Estar implicada en el transporte de proteínas y la transducción de señales.
CCRL1	CC-CKR-11	3.21282	2.36606	Miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Receptor de quimiocinas tipo C-C que se unen a células dendríticas y células T activadas por quimiocinas incluyendo CCL19/ELC, CCL21/SLC, y CCL25/TECK.
DCTN4	-	2.60925	2.47579	-
GUK1	FLJ42686	3.45036	2.65038	Enzima que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a guanosín monofosfato (GMP) para formar guanosín difosfato (GDP). Se cree que esta proteína es un buen objetivo para la quimioterapia en cáncer.
GABRR2	-	3.02568	4.15591	Proteína miembro del complejo del receptor GABA.
ANK1	ANK	3.05296	2.74928	Unen las proteínas integrales de membrana a la espectrina y actina del citoesqueleto. Importante en la motilidad, proliferación, contacto y dominios especializados de membrana.
ANKRD16	-	2.91434	3.98115	-
TXNL4B	DLP	2.83543	2.45545	Papel esencial en el splicing de pre-mRNAs. Requerido en la progresión S/G del ciclo celular.
IDE	FLJ35968	2.35776	3.8867	Metalopeptidasa de zinc que degrada la insulina intracelular. Participa en la señalización intercelular peptídica mediante la degradación de glucágon, amilina, bradiquinina, y calidina.
HIST1H2AB	H2A/m	2.38875	2.56132	Gen del grupo de genes de histonas. Las histonas desempeñar un papel central en la transcripción, regulación, reparación del ADN, replicación del ADN y la estabilidad cromosómica.
ZAR1	-	2.6766	4.2695	Participa en la transición de ovocitos a gametos Esencial para la fertilidad femenina.

Continuación tabla 9

Nombre	Sinónimo	Promedio <i>Log2(Cy3/Cy5)</i>	Promedio <i>KS-test</i>	Función de la proteína
TTC24	FLJ20249	2.61852	2.44384	-
ZCCHC13	CNBP2	3.45241	3.75145	Proteína que contiene seis dedos de zinc de tipo CCHC. Funciona como un factor de transcripción.
ZHX3	KIAA0395	2.64791	3.21947	La proteína codificada contiene dos dedos de zinc del tipo C2H2 y cinco homeodominios. En el núcleo puede funcionar como un represor transcripcional.

(-) Función de la proteína aún no descrita. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>⁹³

Posterior al análisis de los datos con la herramienta Microsoft Office Access, se determinó que 37 fueron los genes cuyo promedio de metilación indicaba estar hipermetilados en el 100% de las muestra del grupo EP y no en el de RC. De estos 37 genes se eligieron 3 para su análisis de metilación por la técnica MSP:

La superfamilia de importantes facilitadores con 6 dominios (MFSD6) es un gen cuya proteína no se ha descrito ni caracterizado aún su función.

La 3' fosfoadenosina 5'fosfosulfatasa sintasa 2 (PAPSS2), es una proteína cuya expresión se observó disminuida en una análisis de expresión de muestras tumorales cervicales del mismo grupo de análisis.

Por último ZCCHC13 (dedos de zinc que contiene 13 dominios del tipo CHC) es una proteína que funciona como factor de transcripción a la que se le ha relacionado con el desarrollo de neoplasias epiteliales y carcinomas del endometrio.

6. Evaluación de la metilación por la técnica MSP

Para poder determinar si los datos obtenidos por los microarreglos eran confiables, se analizó la metilación local de regiones promotoras de los tres genes mencionados anteriormente utilizando otra metodología de análisis de metilación (MSP) que implica la previa modificación del ADN con bisulfito de sodio y el diseño de un par de oligonucleótidos que son complementarios a regiones del ADN metiladas o no metiladas de manera diferencial. En la tabla 10, 12 y 14 se especifica las características de las regiones promotoras de dichos genes, en las figuras 28, 29 y 30 muestran el mapa de la

región y el diseño de los oligonucleótidos para MSP obtenidos por el software MethPrimer, cuya secuencia de oligonucleótidos se especifica en las tablas 11, 13 y 15.

Tabla 10. Características de la región promotora del gen MFSD6

MFSD6; hg18_cpglIslandExt_CpG: 129 range=chr2:190980530-190982116 5'pad=200 3'pad=200 strand=+	
Posición	chr2: 190980530-190982116
Banda	2q32.2
Tamaño genómico	1187
CpG	129
Porcentaje de CpG	21.7%
Porcentaje de C o G	68.6%

genome.ucsc.edu

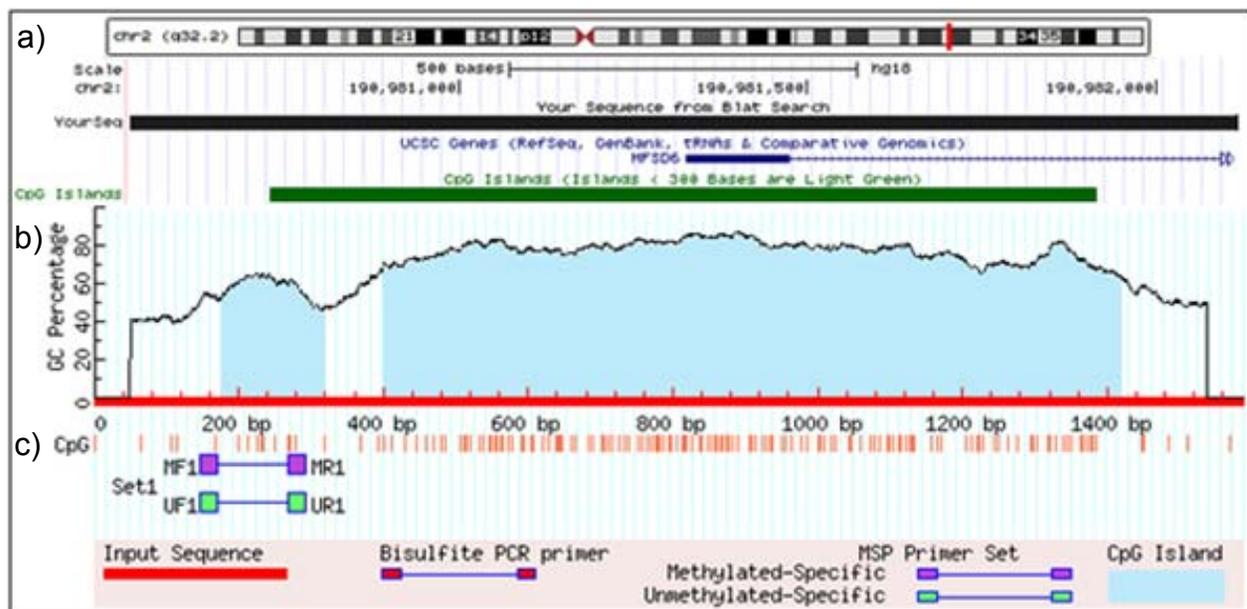


Figura 28. Región promotora del gen MFSD6. Mapa de las islas CpG de la región promotora del gen MFSD6. a) cromosoma 2; en rojo, en el brazo largo se indica el locus del gen; la barra verde determina la ubicación de la región promotora. b) gráfico que representa la densidad de las islas (%CG) dentro de la región promotora, las barras rojas verticales señalan la posición de la citosina susceptible a metilación. c) diseño de oligonucleótidos necesarios para el análisis MSP. En morado, oligonucleótidos para sitios metilados; en verde, oligonucleótidos para sitios no metilados.

Tabla 11. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de MFSD6 por MSP

<i>Metilado</i>	<i>No Metilado</i>
Left Metilado MFSD6 5'TAGTTTTTTTGAAAAAGGGTGTTTTTC3' Tamaño= 25pb Tm= 59.11°C GC%= 52.00 C=6	Left No Metilado MFSD6 5'TAGTTTTTTTGAAAAAGGGTGTTTTTT3' Tamaño= 25pb Tm= 58.72°C GC%= 52.00 C=6
Right Metilado MFSD6 5'ATACTATCAATACGTTATCTCCGCG3' Tamaño= 25pb Tm= 59.84°C GC%= 56.00 C=4	Right No Metilado MFSD6 5'ACTATCAATACATTATCTCCACATC3' Tamaño= 25pb Tm= 53.42°C GC%= 60.00 C=6
Tamaño del producto Metilado: 148	Tamaño del producto No Metilado: 146
MethPrimer: designing primers for methylation PCRs	

Tabla 12. Características de la región promotora del gen PPSS2

PPSS2; hg18_cpGISlandExt_CpG: 69 range=chr10:89409127-89410207 5'pad=200 3'pad=200 strand=+

Posición	chr10: 89409127-89410207
Banda	10q23.2
Tamaño genómico	681
Número de CpG	69
Porcentaje de CpG	20.3%
Porcentaje de C o G	67.3%

genome.ucsc.edu

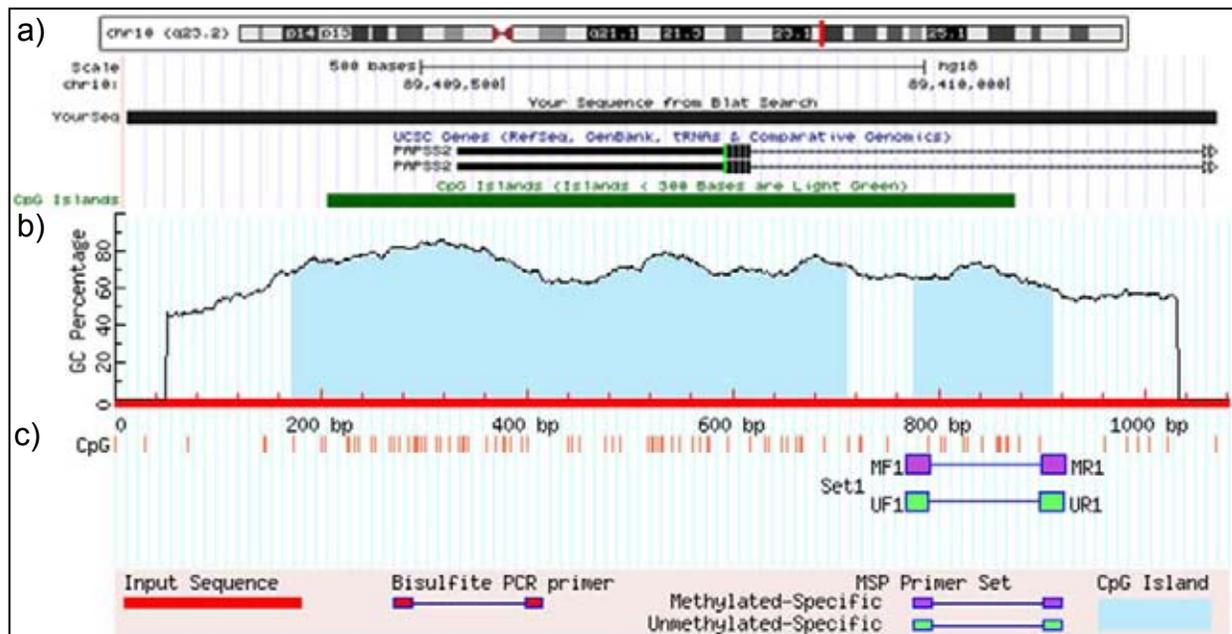


Figura 29. Región promotora del gen PPSS2 Mapa de las islas CpG de la región promotora del gen PPSS2. a) cromosoma 10, en rojo en el brazo largo se indica el locus del gen; la barra verde indica la ubicación de la región promotora. b) grafico que representa la densidad de las islas (%CG) dentro de la región promotora, las barras rojas verticales señalan la posición de las citosinas susceptibles a metilación. c) Diseño de oligonucleótidos necesarios para el análisis MSP. En morado, oligonucleótidos para sitios metilados; en verde, oligonucleótidos para sitios no metiladas.

Tabla 13. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de PAPSS2 por MSP

<i>Metilado</i>	<i>No Metilado</i>
Left Metilado PAPSS2 5'TATTTGTTATAATTGTGGGAGAAGC3' Tamaño= 25pb Tm= 57.86°C GC%= 52.00 C=5	Left No Metilado PAPSS2 5'ATTTGTTATAATTGTGGGAGAAGTG3' Tamaño= 25pb Tm= 57.71°C GC%= 52.00 C=6
Right Metilado PAPSS2 5'GAACCAAATATCCTAATCTACCGC3' Tamaño= 24pb Tm= 59.33°C GC%= 62.00 C=5	Right No Metilado PAPSS2 5'CACAAACCAAATATCCTAATCTACCA3' Tamaño= 26pb Tm= 59.61°C GC%= 61.54 C=6
Tamaño del amplicón: 110pb	Tamaño del amplicón: 112pb

MethPrimer: designing primers for methylation PCRs

Tabla 14. Características de la región promotora del gen ZCCHC13

ZCCHC13; hg18_cpGISlandExt_CpG: 17 range=chrX: 73440345-73441150
5'pad=300 3'pad=300 strand=+

Posición	chrX: 73440345-73441150
Banda	Xq13.2
Tamaño genómico	206
CpG	17
Porcentaje de CpG	16.5%
Porcentaje de C o G	60.2%

genome.ucsc.edu

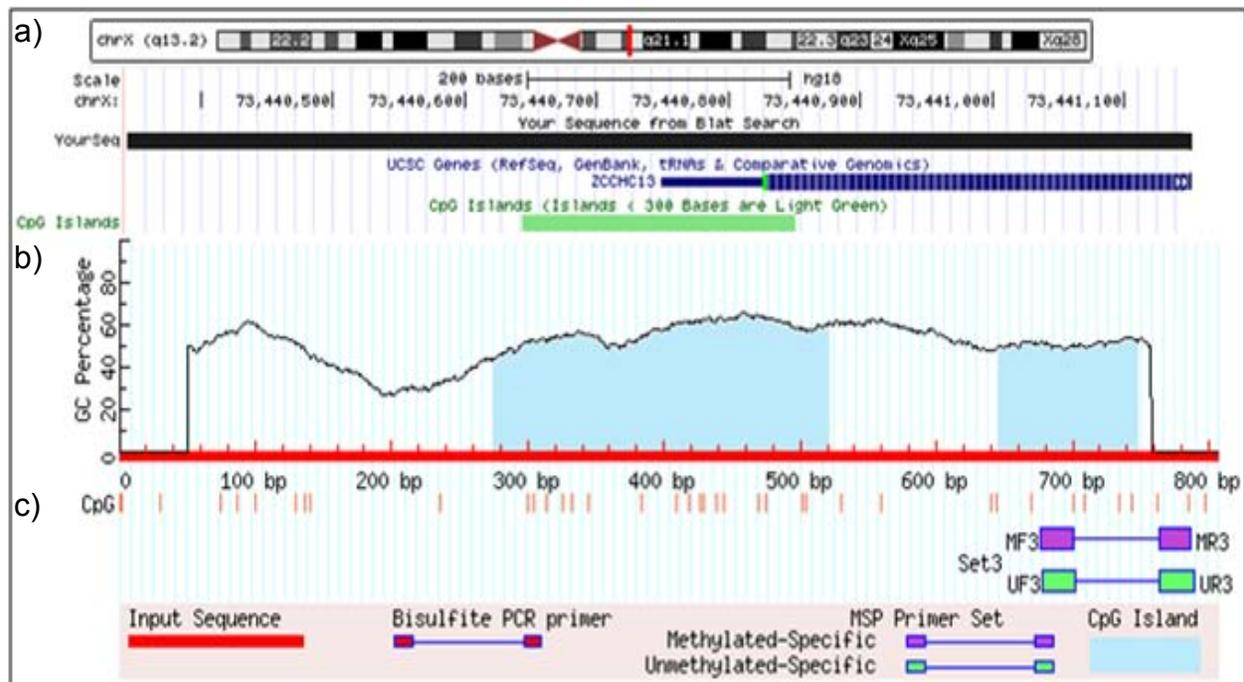


Figura 30. Región promotora del gen ZCCHC13. Mapa de las islas CpG en la región promotora del gen ZCCHC13. a) cromosoma X; en rojo, en el brazo largo se indica el locus del gen; la barra verde determina la ubicación de la región promotora. a) gráfico que representa la densidad de las islas (%CG) dentro de la región promotora, las barras rojas verticales señalan la posición de las citosinas susceptibles a metilación. c) diseño de oligonucleótidos necesarios para el análisis MSP. En morado, oligonucleótidos para sitios metilados; en verde, oligonucleótidos para sitios no metilados.

Tabla 15. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de metilación de ZCCHC13 por MSP

<i>Metilado</i>	<i>No Metilado</i>
Left Metilado ZCCHC13 5'TATTTGTTATAATTGTGGGAGAAGC3' Tamaño= 25pb Tm= 57.86°C GC%= 52.00 C=5	Left No Metilado ZCCHC13 5'ATTTGTTATAATTGTGGGAGAAGTG3' Tamaño= 25pb Tm= 57.71°C GC%= 52.00 C=6
Right Metilado ZCCHC13 5'GAACCAAATATCCTAATCTACCGC3' Tamaño= 24pb Tm= 59.33°C GC%= 62.00 C=5	Right No Metilado ZCCHC13 5'CACAAACCAAATATCCTAATCTACCA3' Tamaño= 26pb Tm= 59.61°C GC%= 61.54 C=6
Tamaño del producto Metilado: 110	Tamaño del producto No Metilado: 112
MethPrimer: designing primers for methylation PCRs	

Posterior al diseño de los oligos, se realizó el análisis de metilación por la técnica MSP, previa modificación del ADN con bisulfito de sodio, de muestras tumorales y de tejido normal de cérvix elegidas azarosamente. Los resultados se reportan en la figura 31.

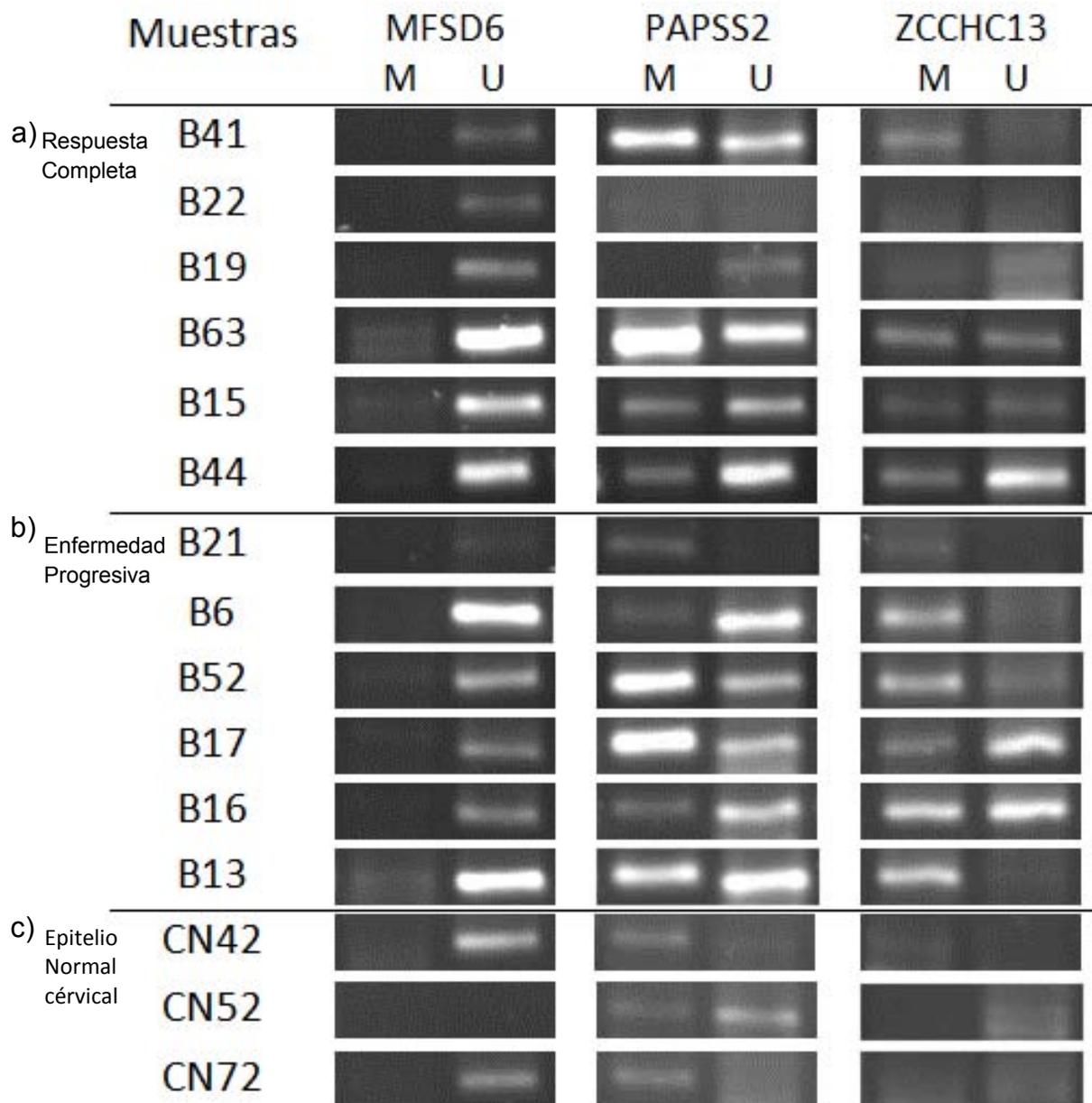


Figura 31. Análisis de metilación de la región promotora de los genes PAPSS2, MFSD6 y ZCCHC13 por la metodología MSP. La columna (M) refiere al producto de PCR realizada con oligonucleótidos complementarios a fragmentos metilados; La columna (U) al producto de PCR realizada con oligonucleótidos complementarios a fragmentos no metilados. a) Muestra tumorales del grupo RC; b) Muestras tumorales del grupo EP; c) Muestras de epitelio normal de cervical libre de displasia.

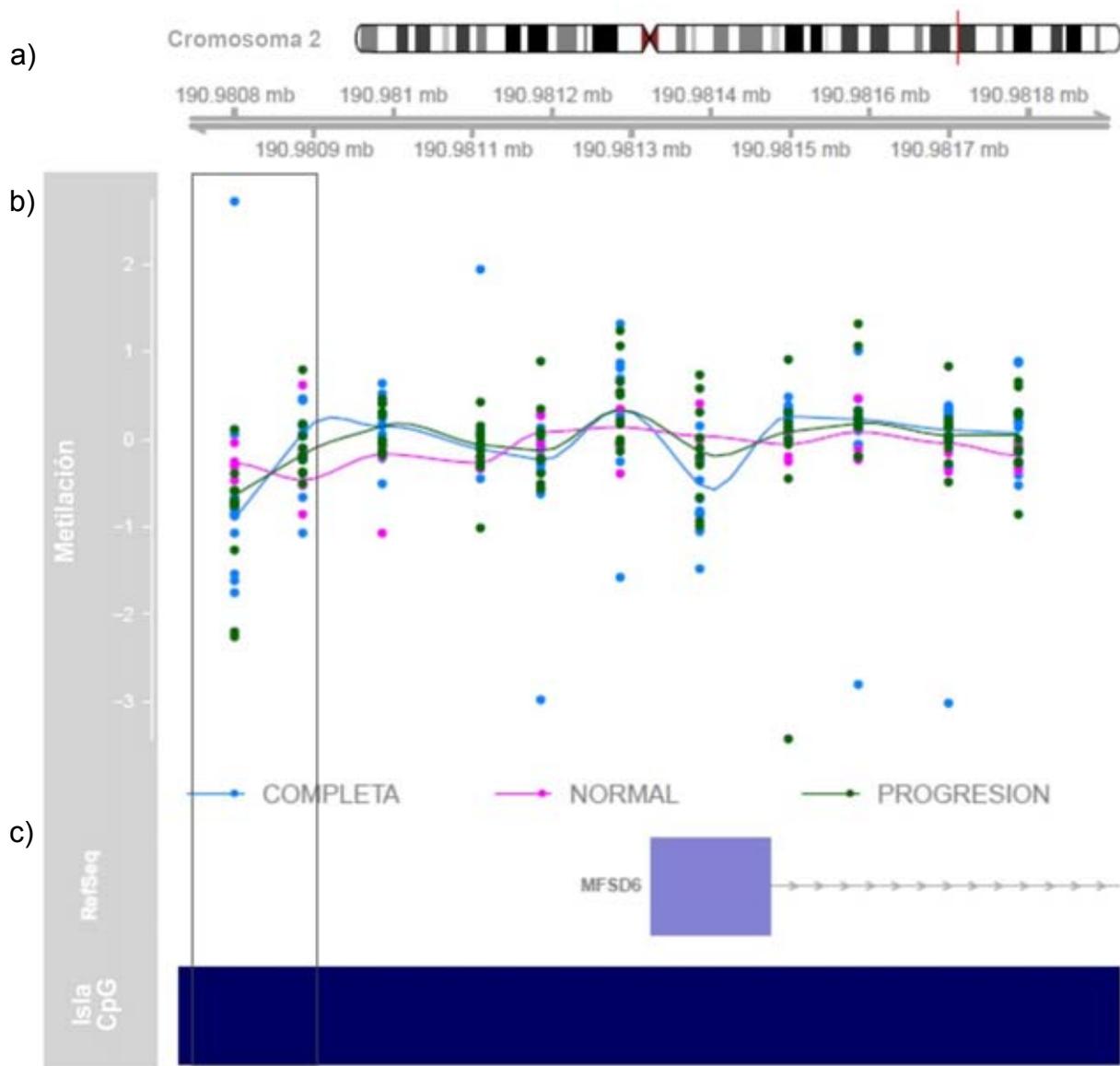


Figura 32. Perfiles de metilación obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen MFSD6. Comportamiento de metilación de todas las muestras consideradas en este estudio. a) Ubicación del gen MFSD6 en el cromosoma 2; b) Grafico que representa en el eje Y el valor de metilación ($\text{Log}_2(\text{Cy}3|\text{Cy}5)$) y en el eje X la longitud de la región. Los puntos corresponde al valor normalizado por sonda de cada muestra (total 11 sondas, 26 muestras). En azul muestras del grupo RC, en verde las muestras del grupo EP y en rosa las muestras de epitelio normal cervical. La línea continua refiere la media del comportamiento por grupo a lo largo de la región promotora; c) Las barras horizontales en azul claro determinan el sitio de inicio de la transcripción de la proteína correspondiente al gen. La barra horizontal azul fuerte representa la densidad de Islas CpG dentro de la región. El rectángulo negro señala la región evaluada por MSP.

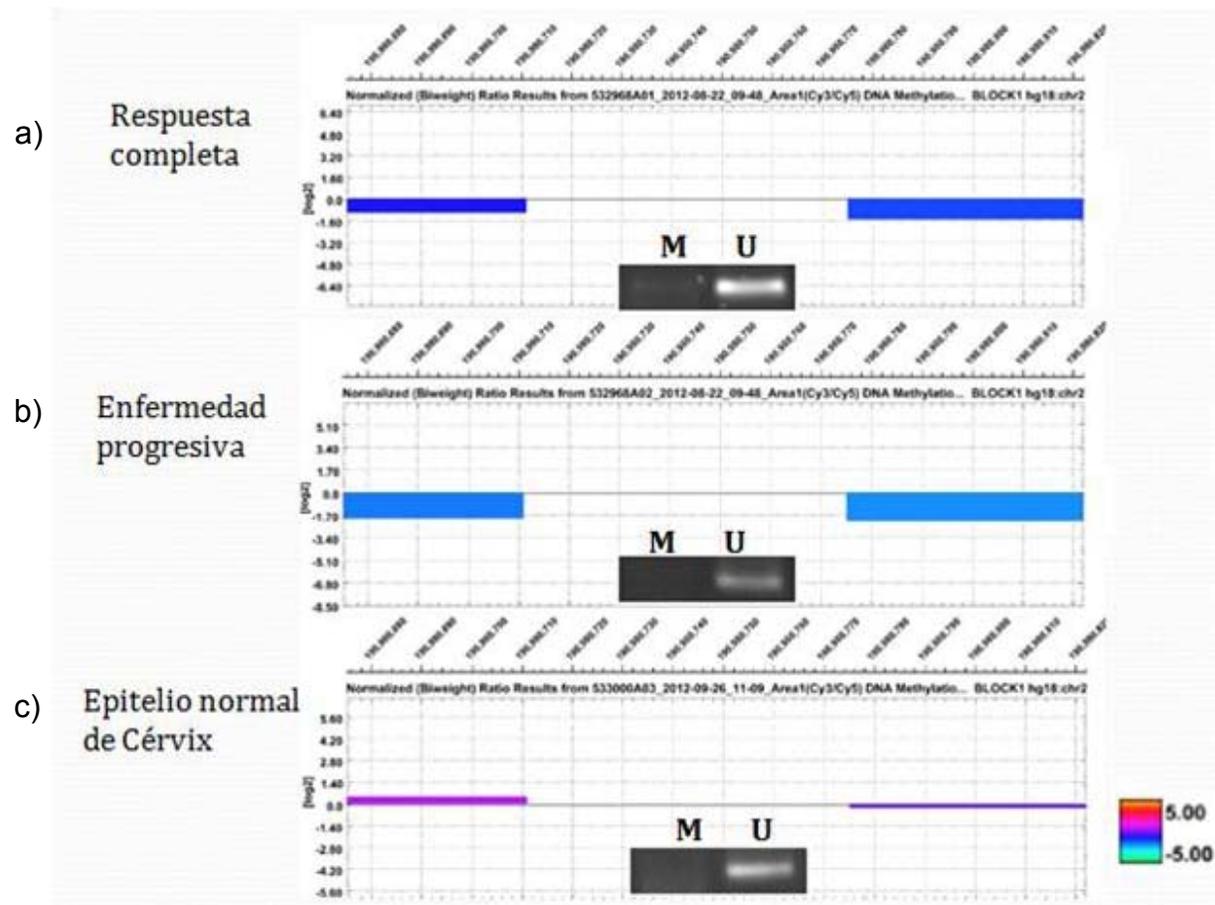


Figura 33. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para la región promotora del gen MFSD6. Comparación de resultados obtenidos por los dos métodos de análisis de metilación para una misma muestra. El gráfico presenta la metilación a lo largo del amplicón obtenido por MSP y en su parte inferior se observa la amplificación por PCR donde (M) es la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN metilado y (U) a la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN no metilado. En a) muestra B15 perteneciente al grupo de respuesta completa; b) muestra B16 del grupo de enfermedad progresiva; c) muestra CN45 de Epitelio normal cervical.

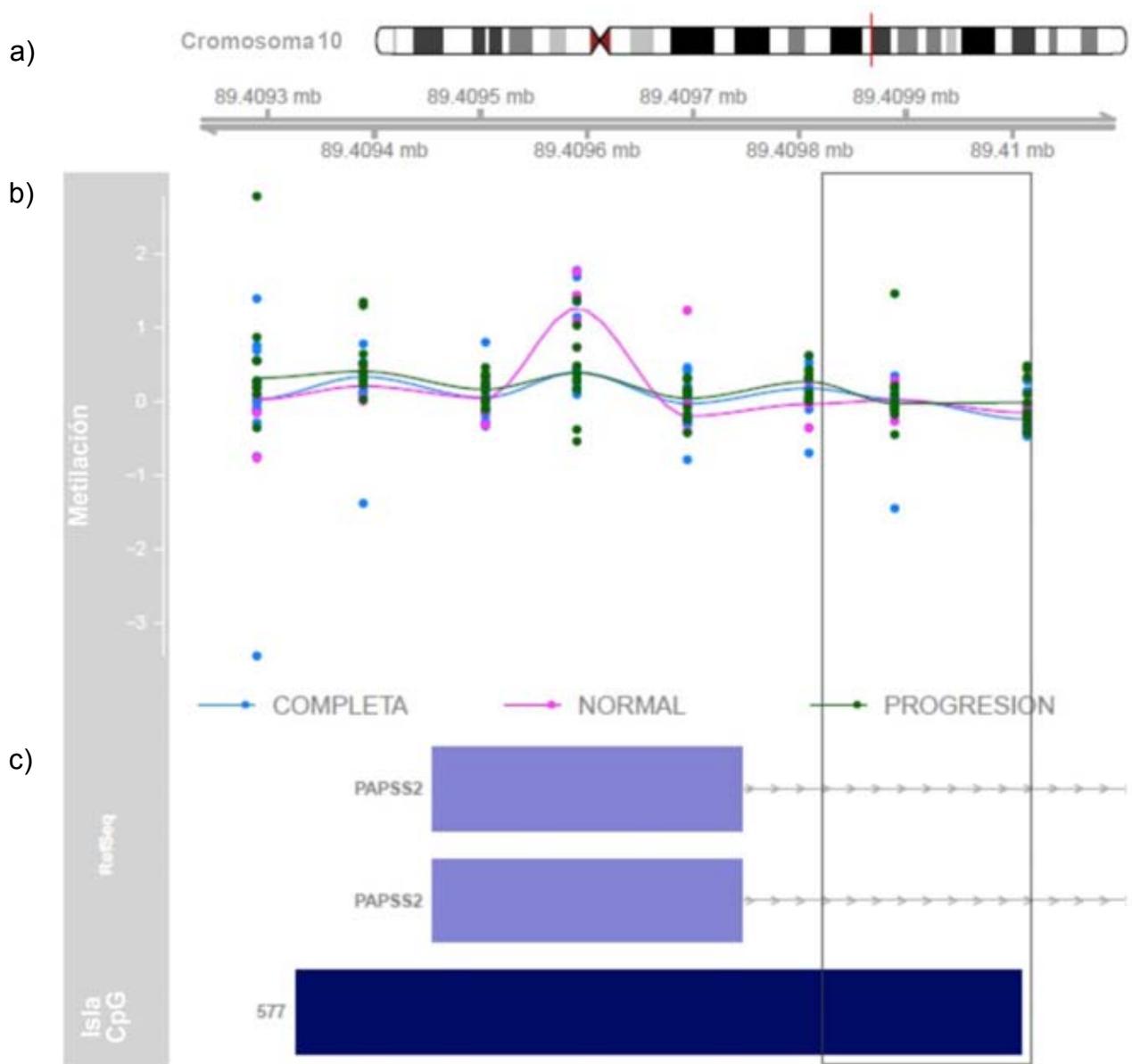


Figura 34. Perfiles de metilación las muestras obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen PAPSS2. Comportamiento de metilación de todas las muestras consideradas en este estudio. a) Ubicación del gen PAPSS2 en el cromosoma 10; b) Grafico que representa en el eje Y el valor de metilación ($\text{Log}_2(\text{Cy}3|\text{Cy}5)$) y en el eje X la longitud de la región. Los puntos corresponde al valor normalizado por sonda de cada muestra (total 11 sondas, 26 muestras). En azul muestras del grupo RC, en verde las muestras del grupo EP y en rosa las muestras de epitelio normal cervical. La línea continua refiere la media del comportamiento por grupo a lo largo de la región promotora; c) Las barras horizontales en azul claro determinan el sitio de inicio de la transcripción de la proteína correspondiente al gen. La barra horizontal azul fuerte representa la densidad de Islas CpG dentro de la región. El rectángulo negro señala la región evaluada por MSP.

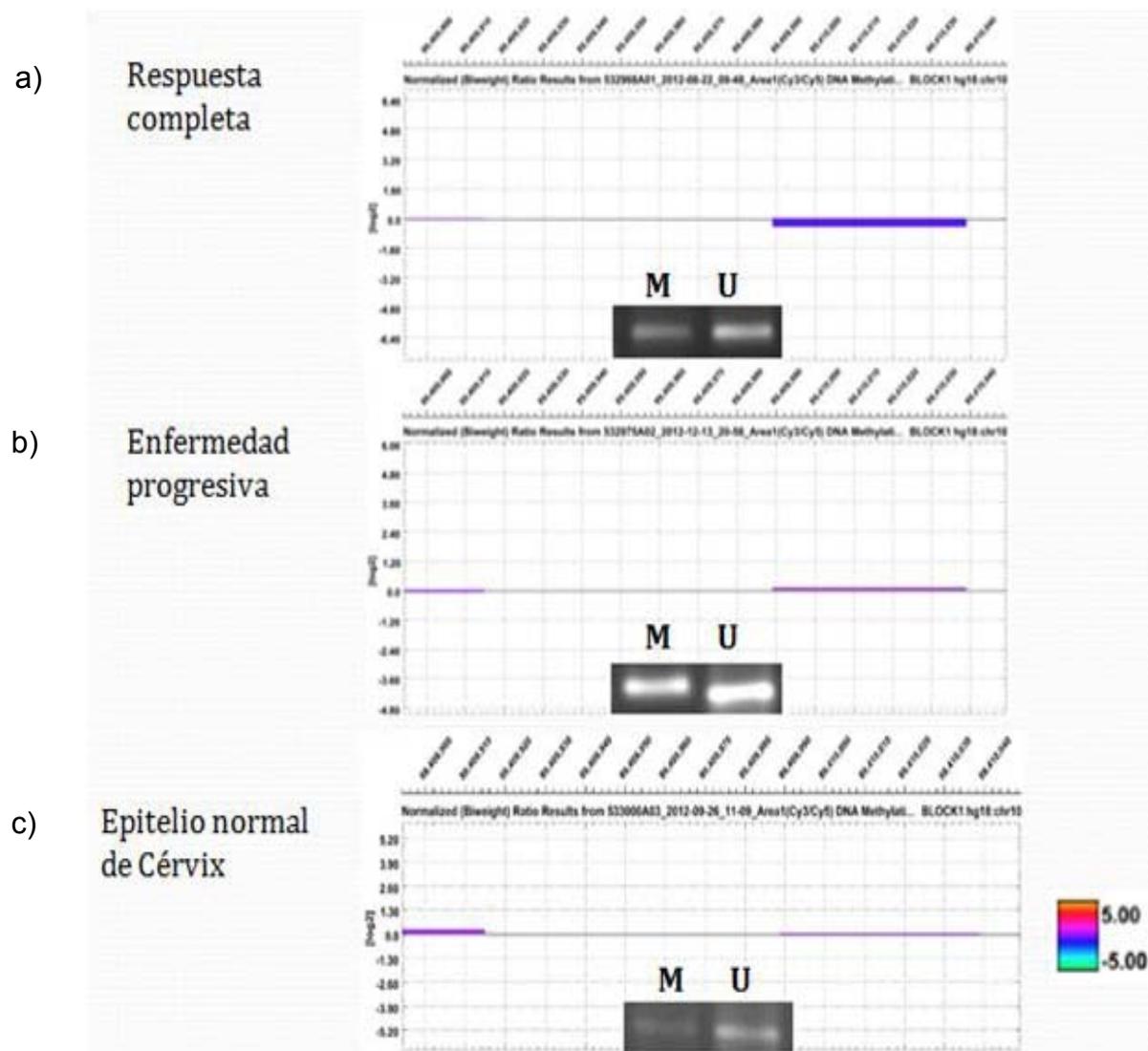


Figura 35. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para la región promotora del gen PAPSS2. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis de metilación para una misma muestra. El grafico representa la metilación a lo largo del amplicón obtenido por MSP y en su parte inferior se observa la amplificación por PCR donde (M) es la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN metilado y (U) a la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN no metilado. En a) muestra B15 perteneciente al grupo de respuesta completa; b) muestra B13 del grupo de enfermedad progresiva; c) muestra CN45 de Epitelio normal cervical.

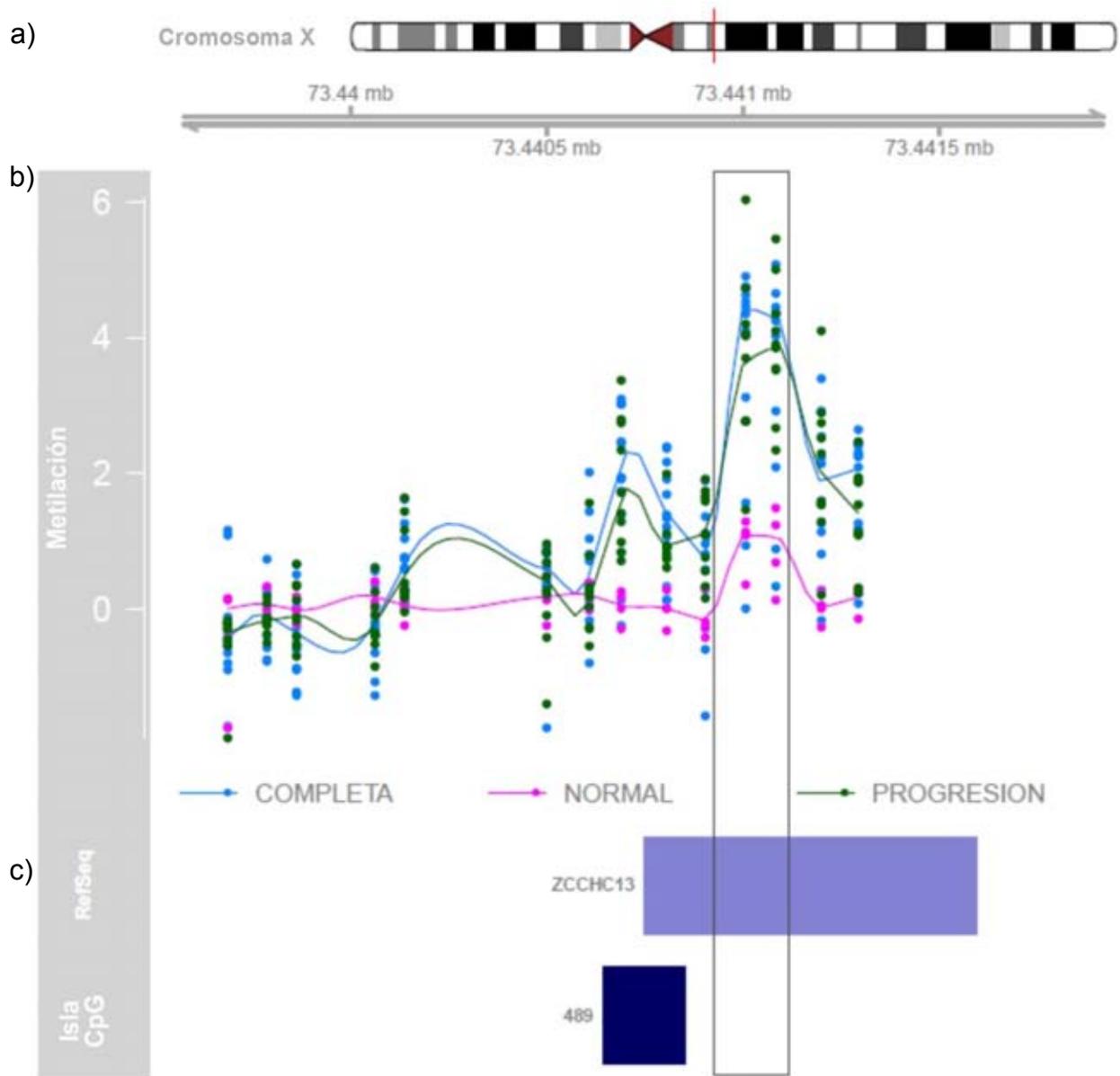


Figura 36. Perfiles de metilación de las muestras obtenidos por el análisis de microarreglos de la región promotora del gen ZCCHC13. Comportamiento de metilación de todas las muestras consideradas en este estudio. a) Ubicación del gen ZCCHC13 en el cromosoma X; b) Grafico que representa en el eje Y el valor de metilación ($\text{Log}_2(\text{Cy}3|\text{Cy}5)$) y en el eje X la longitud de la región. Los puntos corresponde al valor normalizado por sonda de cada muestra (total 11 sondas, 26 muestras). En azul muestras del grupo RC, en verde las muestras del grupo EP y en rosa las muestras de epitelio normal cervical. La línea continua refiere la media del comportamiento por grupo a lo largo de la región promotora; c) Las barras horizontales en azul claro determinan el sitio de inicio de la transcripción de la proteína correspondiente al gen. La barra horizontal azul fuerte representa la densidad de Islas CpG dentro de la región. El rectángulo negro señala la región evaluada por MSP.

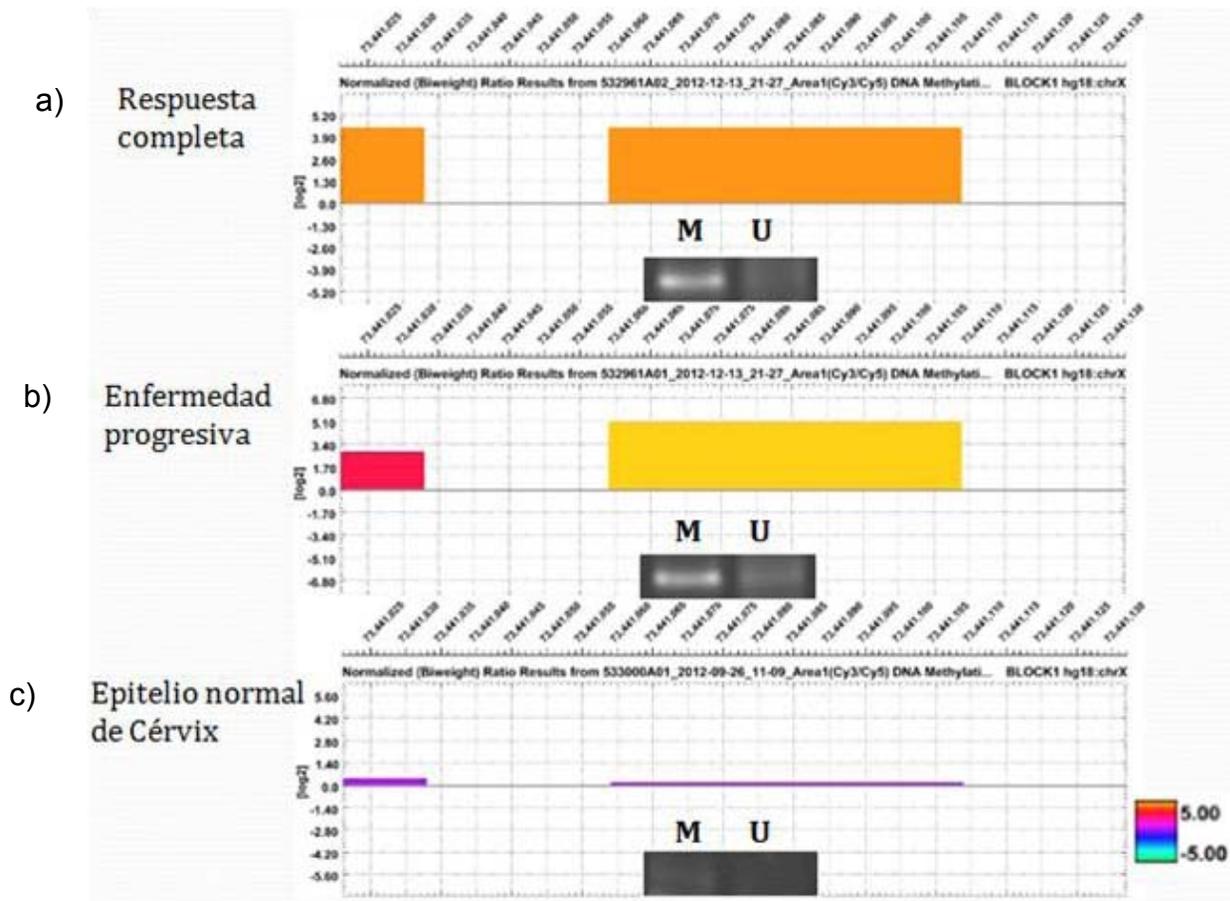


Figura 37. El resultado de metilación por MSP es similar al obtenido con el análisis de microarreglos para la región promotora del gen **ZCCHC13**. Comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos de análisis de metilación para una misma muestra. El grafico representa la metilación a lo largo del amplicón obtenido por MSP y en su parte inferior se observa la amplificación por PCR donde (M) es la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN metilado y (U) a la reacción con oligonucleótidos complementarios a ADN no metilado. En a) muestra B63 perteneciente al grupo de respuesta completa; b) muestra B52 del grupo de enfermedad progresiva; c) muestra CN17 de Epitelio normal cervical.

7. Segundo análisis utilizando el lenguaje de programación R

Para este análisis, como se indicó en la metodología, se extrajeron los valores ($\text{Log}_2(\text{Cy}3|\text{Cy}5)$) de cada sonda y se obtuvo el valor promedio de metilación por cada región promotora. Se agruparon los valores de cada muestra según su clasificación (tumoral ó epitelio normal) para determinar si existen diferencias significativas de metilación entre los grupos comparados utilizando la prueba t de Student con una $p \leq 0.005$ (Tabla 16 y figura 38).

Tabla 16. Número de genes que presentan una metilación diferencial significativa en el grupo tumoral en comparación con el normal

	Total	$p \leq 0.005$
Genes Hipermetilados en Cáncer	9794	2196
Genes Hipometilados en Cáncer	2630	3734

El análisis se realizó por prueba paramétrica t de Student
El resultado anterior se especifica en la siguiente gráfica (Figura 38).

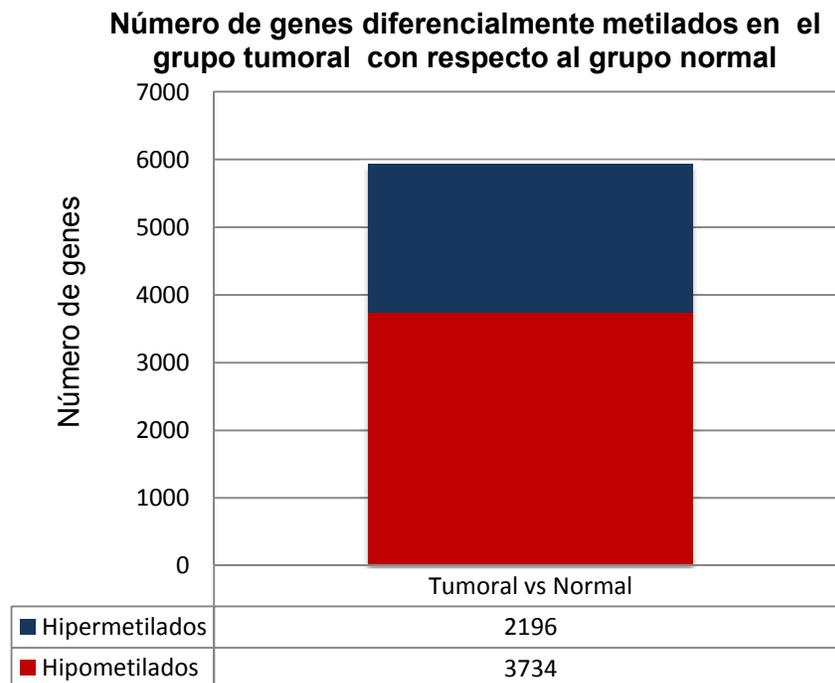


Figura 38. Número de genes diferencialmente metilados en el grupo tumoral con respecto al grupo normal. Gráfico de barras que muestra el número de genes hipermetilados (azul) e hipometilados (rojo) en las muestras del grupo tumoral, resultado de la comparación de las medias de grupos por el análisis estadístico t Student con una $p \leq 0.005$.

A partir de los genes que resultaron estar diferencialmente metilados ($p \leq 0.005$) en la comparación tumoral vs normal (Tabla 16, figura 38), se realizó el análisis no supervisado con el que se obtuvo el siguiente mapa de calor (Figura 39) y gráfica de volcán (Figura 40).

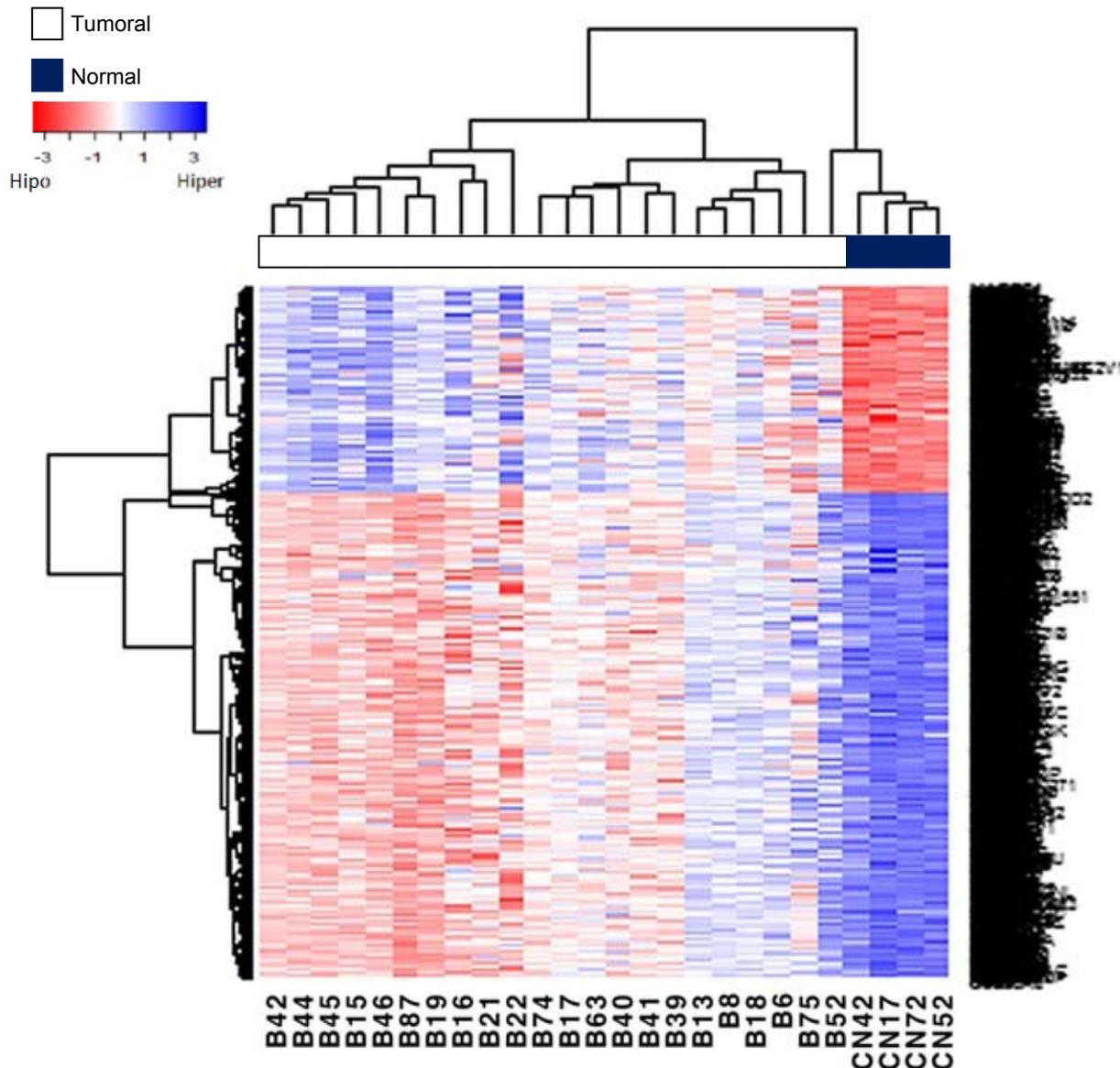


Figura 39. Mapa de Calor con los genes diferencialmente metilados en el grupo Tumoral comparado con el grupo Normal. Genes diferencialmente metilados (5930) en la comparación entre el grupo tumoral vs normal ($p \leq 0.005$). En la parte superior, se observa el dendrograma que determina el agrupamiento de las muestras de tejido normal (azul) y tumoral (blanco y negro). Cada columna representa el perfil de metilación de una muestra. Las filas horizontales corresponden a un mismo gen. En azul promotores de genes hipermetilados; en rojo promotores de genes hipometilados. Análisis no supervisado.

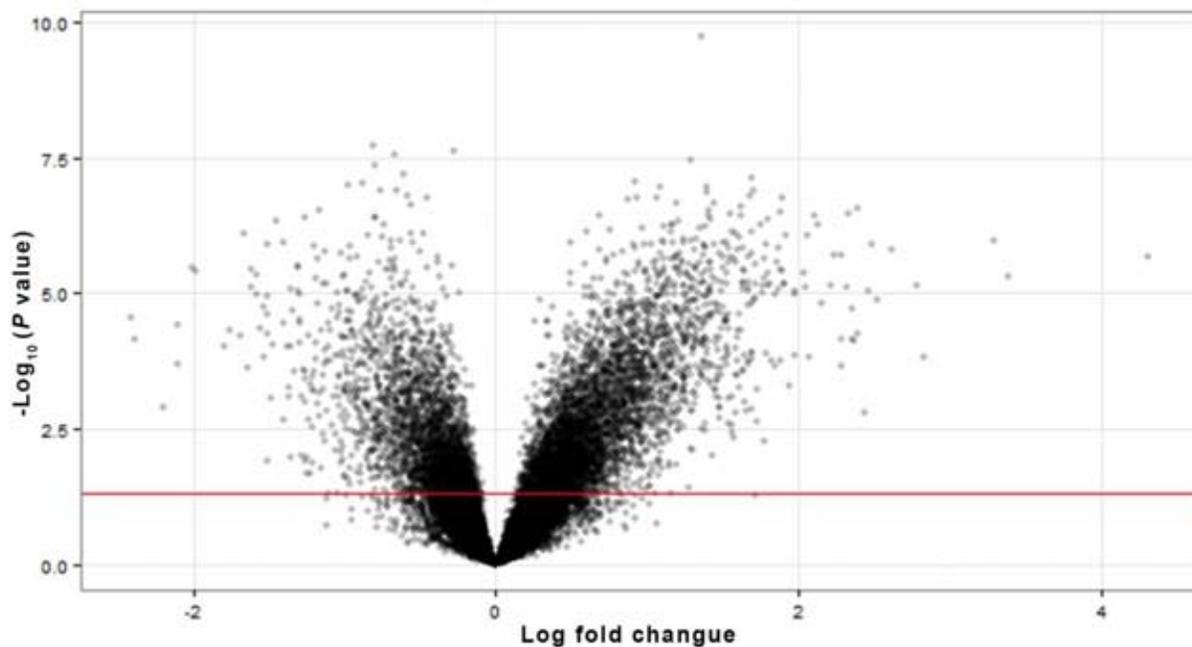
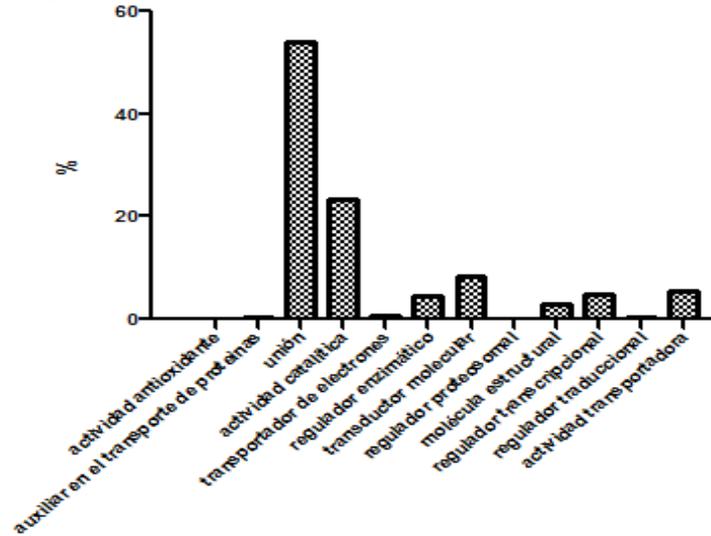


Figura 40. Gráfica de volcán con los genes diferencialmente metilados en el grupo tumoral comparado con el grupo normal. Gráfica de volcán que representa la distribución de metilación de los promotores de los 5930 genes diferencialmente metilados al realizar la comparación entre los grupos de tumoral y normal.

Posterior al análisis de distribución de probabilidad t de Student se analizó la función molecular y procesos biológicos en los que participan los genes que mostraron estar hipermetilados en el grupo de cáncer y no así en el normal con una $p \leq 0.005$ (Figura 41). La búsqueda de funcionalidad y proceso biológico de las proteínas se analizó también para los genes que se encuentran hipometilados en el grupo de cáncer y no en el grupo normal con una $p \leq 0.005$ (Figura 42).

La búsqueda se efectuó con la herramienta *Onto-Express Intelligent systems and bioinformatics laboratory* del departamento de ciencia computacional de la Universidad estatal de Wayne, Detroit.

a) Procesos biológicos



b) Función molecular

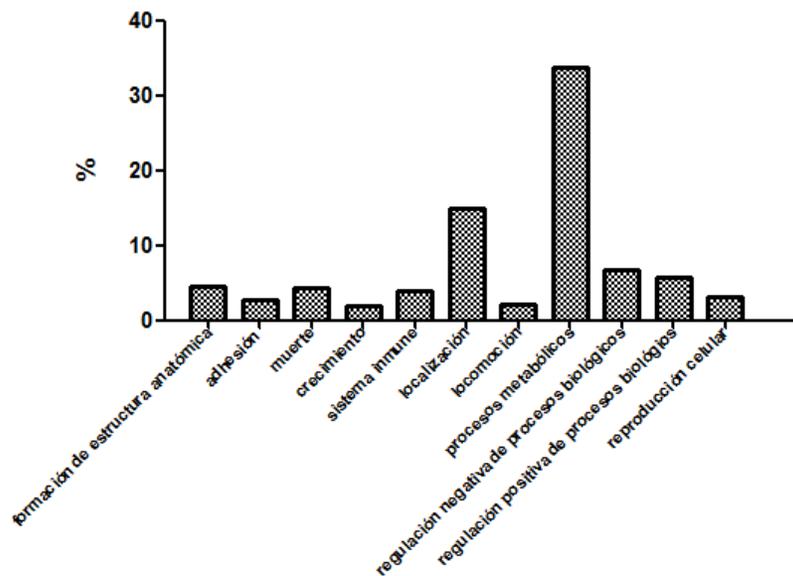
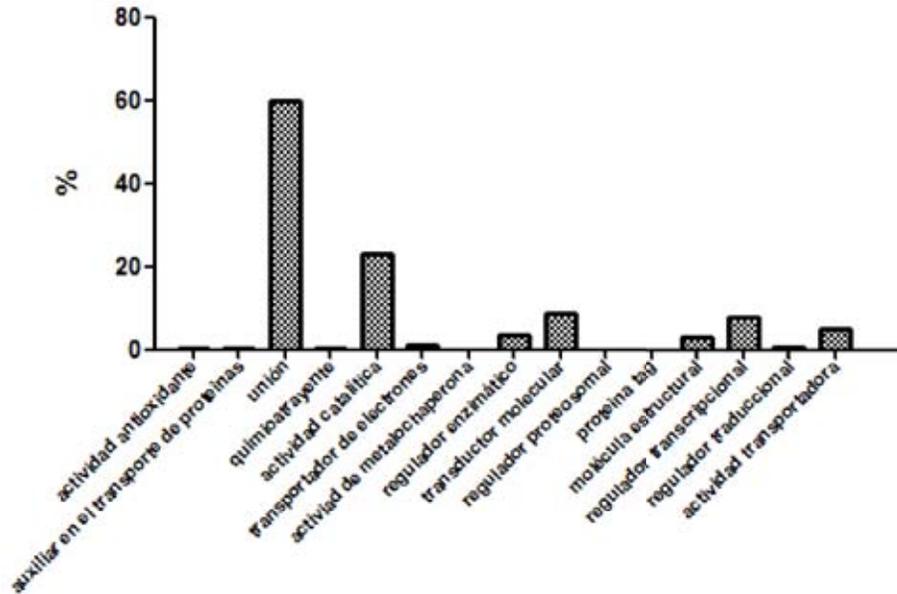


Figura 41. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipermetilados en muestras tumorales. a) Procesos biológicos en el que participan las proteínas de los 2196 genes hipermetilados en el grupo de muestras tumorales con respecto a los tejidos normales. b) Función molecular en el que participan las proteínas pertenecientes a los 2196 genes hipermetilados en el grupo de muestras tumorales con respecto a los tejidos normales. Para cada proceso biológico y función molecular se muestra el porcentaje de genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.005$) según el análisis t de Student.

a) Procesos biológicos



b) Función molecular

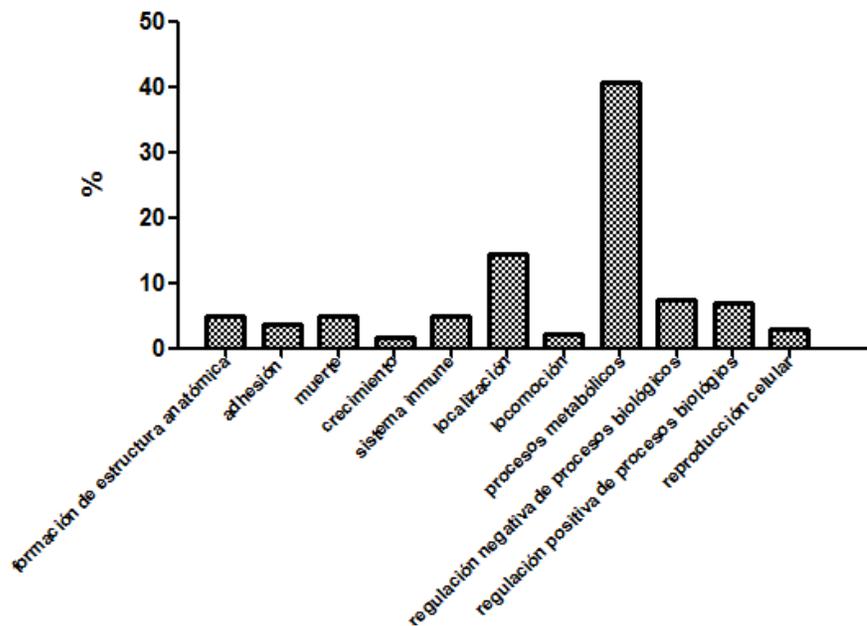


Figura 42. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipometilados en muestras del grupo Tumoral. a) Procesos biológicos en el que participan las proteínas de los 3734 genes hipometilados en el grupo de muestras tumorales con respecto a los tejidos normales. b) Función molecular en el que participan las proteínas pertenecientes a los 3734 genes hipometilados en el grupo de muestras tumorales con respecto a los tejidos normales. Para cada proceso biológico y función molecular se muestra el porcentaje de genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.005$) según el análisis t de Student.

Tabla 17. Número de genes que presentan una metilación diferencialmente significativa en el grupo EP con respecto al grupo RC

	Total	$p \leq 0.005$
Genes Hipermetilados en Enfermedad Progresiva	11783	273
Genes Hipometilados en Enfermedad Progresiva	11547	23

El análisis se realizó por la prueba paramétrica t de Student

El resultado anterior se especifica en la siguiente gráfica (Figura 43).

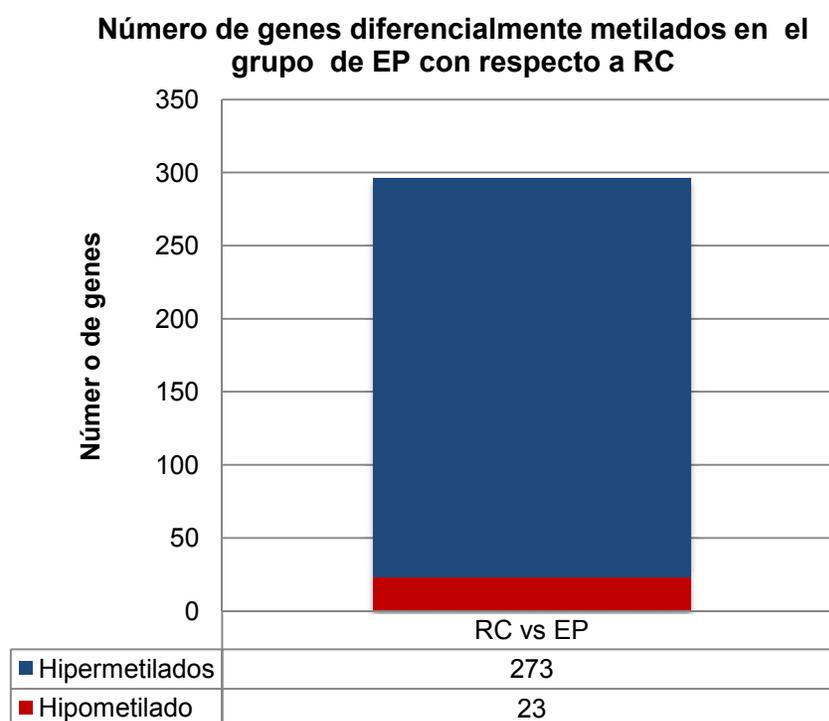


Figura 43. Número de genes diferencialmente metilados en el grupo EP con respecto a RC. Gráfico de barras que muestra el número de genes hipermetilados (azul) e hipometilados (rojo) en las muestras del grupo de enfermedad progresiva (EP), resultado de la comparación de las medias de grupos por el análisis estadístico t Student con una $p \leq 0.005$.

A partir de los genes que mostraron estar diferencialmente metilados ($p \leq 0.005$) en la comparación EP vs RC (Tabla 17, figura 43), se realizó el análisis no supervisado con el que se obtuvo el siguiente mapa de calor (Figura 44) y gráfica de volcán (Figura 45).

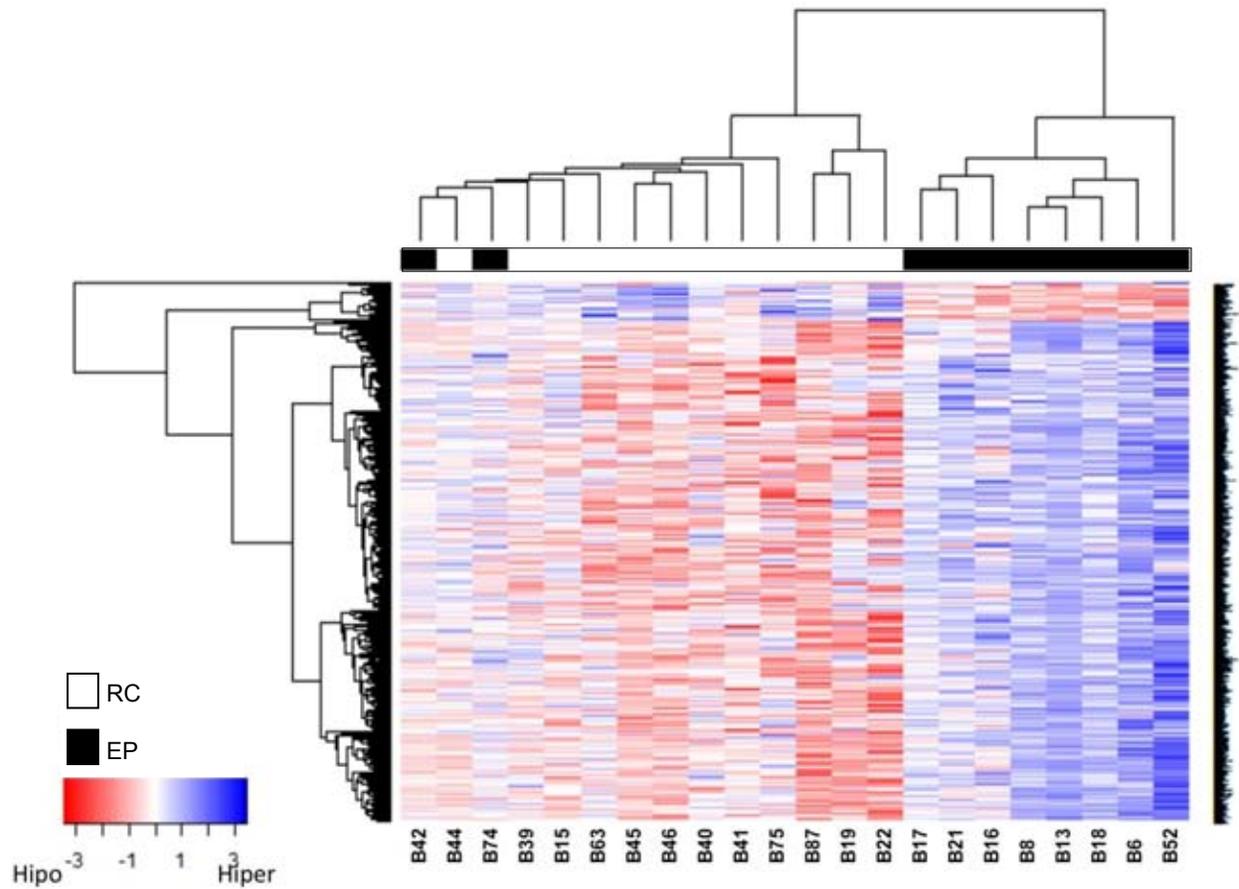


Figura 44. Mapa de Calor con los genes diferencialmente metilados en el grupo EP comparado con el grupo RC. Genes diferencialmente metilados (296) en la comparación entre el grupo de enfermedad progresiva (EP) vs Respuesta completa (RC). En la parte superior se observa el dendograma con el agrupamiento de las muestras tumorales EP (negro) y tumorales RC (blanco). Cada columna representa el perfil de metilación de una muestra. Las filas horizontales corresponden a un mismo gen. En azul promotores de genes hipermetilados; en rojo promotores de genes hipometilados. Análisis no supervisado.

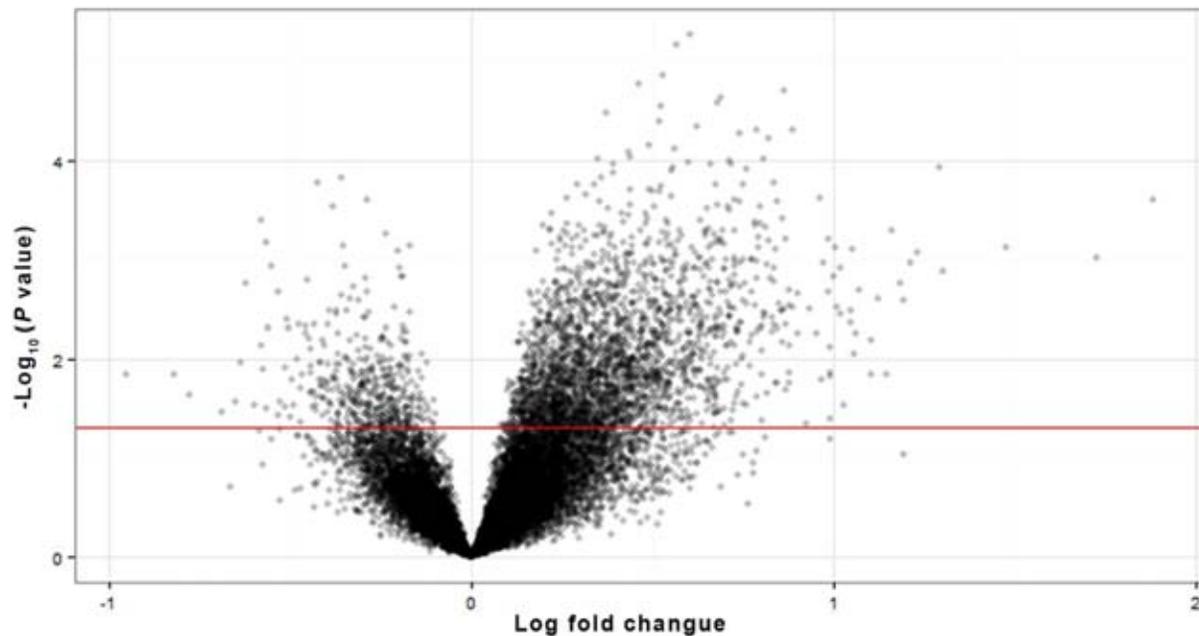


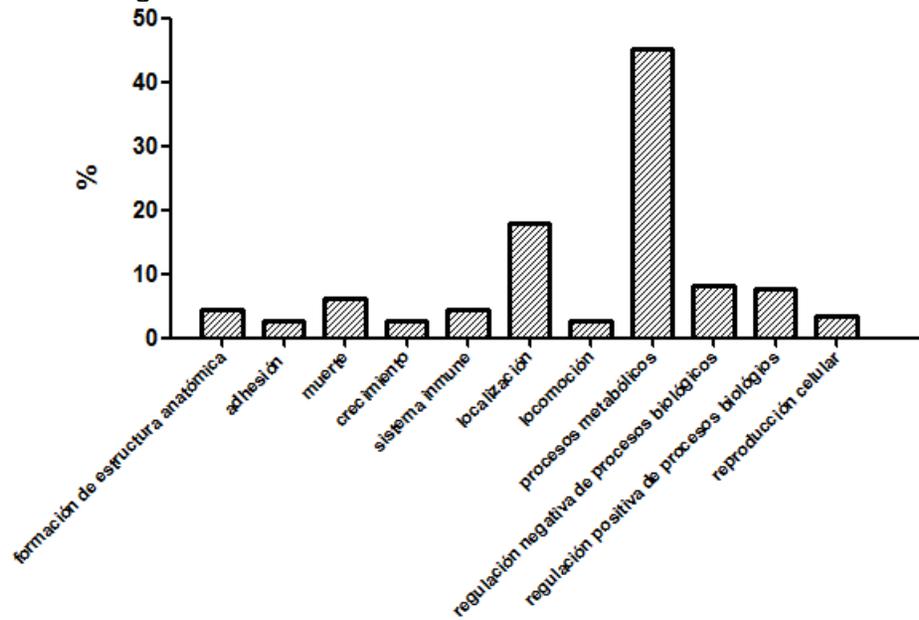
Figura 45. Gráfica de volcán con los genes diferencialmente metilados en el grupo EP comparado con el grupo RC. Gráfica de volcán que representa la distribución de metilación de los promotores de los 296 genes diferencialmente metilados al realizar la comparación entre los grupos de EP y RC.

Posterior al análisis de distribución de probabilidad t de Student, se analizó la función molecular y procesos biológicos en los que participan los genes que mostraron estar hipermetilados en el grupo de enfermedad progresiva y no así en el respuesta completa con una $p \leq 0.005$ (Figura 46).

La búsqueda de funcionalidad y proceso biológico de las proteínas se analizó también para los genes que se encuentran hipometilados en el grupo de EP y no en el grupo RC con una $p \leq 0.005$ (Figura 47).

La búsqueda se efectuó con la herramienta *Onto-Express Intelligent systems and bioinformatics laboratory* del departamento de ciencia computacional de la Universidad estatal de Wayne, Detroit.

a) Proceso biológico



b) Función molecular

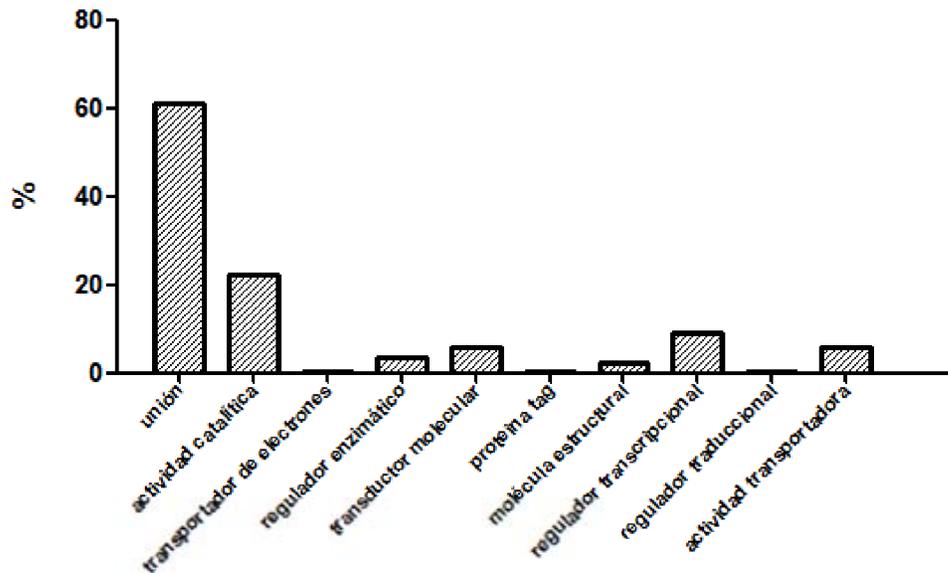
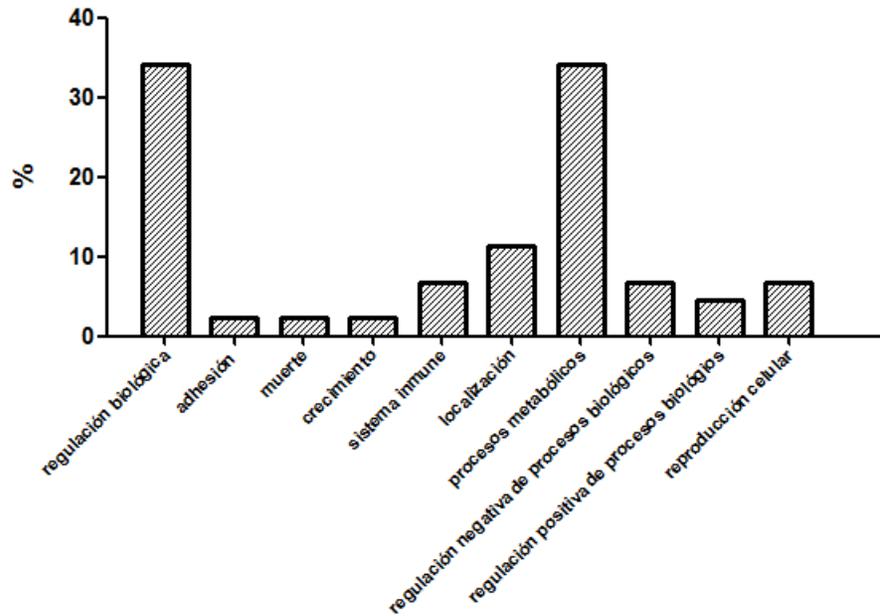


Figura 46. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipermetilados en muestras del grupo EP. a) Procesos biológicos en el que participan las proteínas de los 273 genes hipermetilados en las muestras del grupo EP con respecto a las de RC. b) Función molecular en el que participan las proteínas pertenecientes a los 273 genes hipermetilados en el grupo de muestras EP con respecto a los de RC. Para cada proceso biológico y función molecular se muestra el porcentaje de genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.005$) según el análisis t de Student

a) Proceso biológico



b) Función molecular

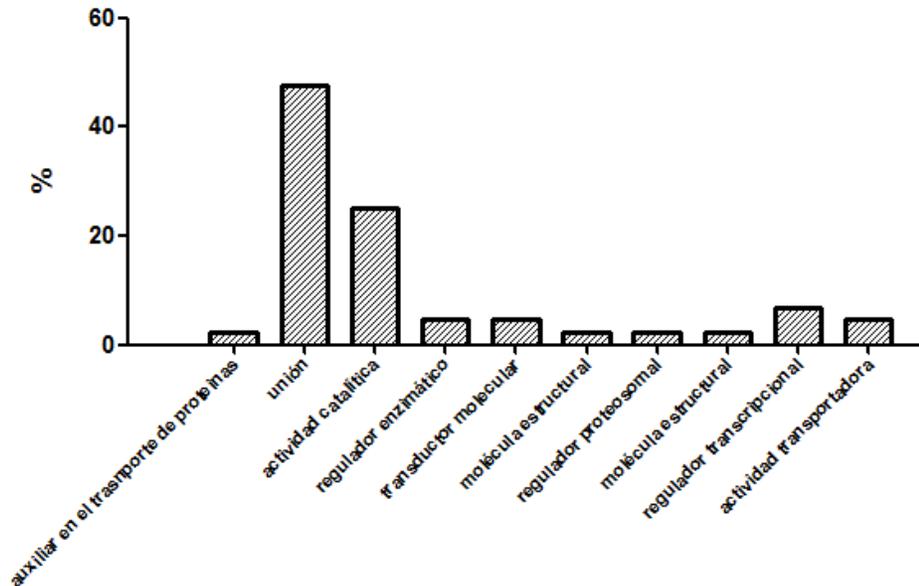


Figura 47. Gráficos de barras que representan los principales procesos biológicos y función molecular en los que participan los genes con promotores hipometilados en muestras del grupo EP. a) Procesos biológicos en el que participan las proteínas de los 23 genes hipometilados en las muestras del grupo EP con respecto a las de RC .b) Función molecular en el que participan las proteínas pertenecientes a los 23 genes hipometilados en el grupo de muestras EP con respecto a los de RC. Para cada proceso biológico y función molecular se muestran los porcentajes de genes que presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.005$) según el análisis t de Student.

La regulación epigenética, en particular la metilación del ADN, juega un papel fundamental en el desarrollo de carcinomas, ya sea como iniciadores del evento tumoral o como potenciadores del desarrollo de la neoplasia.

En este trabajo se evaluó el estado de metilación global del ADN de distintas muestras tumorales y de epitelio normal de cérvix, utilizando herramientas como marcaje e hibridación sobre sondas de microarreglos y metodologías que emplean enzimas de restricción, modificación de ADN y PCR.

Posterior al marcaje e hibridación del material genético sobre sondas de microarreglos, se obtuvieron los valores de metilación correspondientes a cada una de las sondas, las cuales cubrían la región promotora de aproximadamente 22 532 genes. Estos datos se analizaron con dos distintas metodologías y se validaron los resultados por MSP.

Primer análisis de resultados

En este primer análisis, como se describe en el capítulo de metodología, se comparó el comportamiento de metilación entre muestras del grupo RC vs EP. Basándonos en la metodología de análisis propuesta por Chang y cols. Se aplicó un primer filtro a los datos en el que solo nos quedamos con valores ≥ 2 tanto para el valor normalizado de la señal como para la prueba de Kolmogorov-Smirnov (cumpliéndose ambas condiciones) esperábamos que los valores obtenidos dieran información acerca de la hipermetilación de los promotores por ser solo valores positivos. En este análisis se decidió evaluar la hipermetilación de los promotores por ser el evento de metilación que en diversos estudios presentan una mayor relevancia en la participación de la generación y selección de las células neoplásicas, sin embargo la hipometilación resulta también ser un evento epigenético con gran impacto en la carcinogénesis pero menos estudiado y caracterizado por la limitante de que una restauración en la metilación en células neoplásicas resulta ser más complicada por su inespecificidad. A través de un diagrama de Van Euler (Figura 27), se determinó el número de genes que estuvieron hipermetilados en el 80% de las muestras del grupo EP y no en RC. De esta lista de

genes (397 en total), determinamos cuales, según este análisis, se encuentran hipermetilados en el 100% de las muestras EP (10/10). De esta lista representada por 37 genes, se buscó la función de la proteína para la que codifican y su potencial participación en la carcinogénesis (Tabla 9) proponiendo que al estar hipermetilada su región promotora, probablemente existirá una pérdida o disminución en la expresión de la proteína como se ha propuesto que sucede a causa del rearrreglo en la estructura de la cromatina a heterocromatina por presencia de la metilación evitando la unión de factores de transcripción. Entre ellas encontramos a la Aprataxina, proteína implicada en la reparación del ADN por lo que la pérdida de su expresión podría estar relacionada al silenciamiento del gen APTX por hipermetilación del promotor, promoviendo la acumulación de mutaciones que favorecen la transformación celular.⁹⁴ También se encuentra la apolipoproteína que contiene un dominio L (APOLD1) que participa en la regulación de la señalización, función vascular y angiogénesis por lo que la pérdida de su expresión puede verse reflejado en la evasión de señales intracelulares.⁹⁵ La proteína del gen SERPINB9 se ha visto involucrada en procesos celulares como la remodelación de la matriz extracelular y apoptosis aunque su sobreexpresión evita que los linfocitos T citotóxicos eliminen algunas células tumorales comportamiento que no se esperaría por encontrarse hipermetilado.⁹⁶ Otra proteína importante es la Calpaina 14 (CAPN14) cuya pérdida afecta procesos celulares como apoptosis, división celular y plasticidad celular que en una célula podría favorecer el fenotipo tumoral.⁹⁷ Ankarin1 (ANK1) es una proteína integral de membrana cuya pérdida de expresión se ha relacionado con el desarrollo de cáncer colorrectal, tumores de vejiga⁹⁸ y recientemente en cáncer de ovario.⁹⁹ La proteína del gen HIST1H2AB tiene un papel fundamental en la organización del ADN por formar parte de la familia de histonas, su pérdida podría favorecer al mal ordenamiento de la cromatina afectando mecanismos de reparación de ADN, replicación, transcripción y estabilidad genómica. Por último el gen ZHX3 cuya proteína se conoce por ser represor transcripcional en núcleo, se ha asociado su pérdida de expresión como un paso crítico en la carcinogénesis hepatocelular.¹⁰⁰ Estos son algunos de los genes que por la función o papel de sus proteínas en distintos mecanismos y procesos celulares pueden ser de interés el desarrollo de la neoplasia, aunque cabe mencionar que los 37 genes determinados en este primer análisis,

ninguno esta previamente reportado en la búsqueda “Pubmeth” con antecedentes de hipermetilación en cáncer cervical (Tabla 2) o en la literatura citada en este trabajo.

A partir de los genes que el análisis de Access indicó estar hipermetilado en el 100% de las muestras EP y no en RC, se eligieron tres candidatos para su análisis de metilación con MSP y poder validar los resultados obtenidos con los microarreglos: MFSD6 es un gen al que no se ha descrito ni caracterizado la función de su proteína y no se encontrado alguna relación con enfermedades neoplásicas siendo esto lo que nos llevó a que fuera de nuestro interés por su posible papel en cáncer cervical. Al segundo gen elegido, PAPSS2, se le ha relacionado con cáncer esofágico determinando la existencia de la proteína paciente de mejor pronóstico.¹⁰¹ En un análisis de expresión realizado por nuestro grupo de investigación, la proteína de este gen mostró tener una expresión disminuida en el mismo grupo de muestras con cáncer cervical comparado con su expresión en tejido normal.; una posible explicación a la disminución de su expresión puede ser la hipermetilación en la región promotora de su gen por lo que fue de nuestro interés determinar si esta relación existía. Por último se sabe muy poco del gen ZCCHC13 que también elegimos para su validación, pero al contener seis dedos de zinc de tipo CCHC en la estructura de su proteína, se cree que pueda ser un importante factor de transcripción. Su proteína se le ha relacionado con la regulación transcripcional del gen ATXN1¹⁰² presente en neoplasia epitelial y carcinoma del endometrio. Estos tipos de cáncer guardan una relación histológica estrecha con el carcinoma epidermoide cervical y adenocarcinoma cervical lo que nos hace suponer una posible relación.

Como metodología para la validación de los resultados de metilación se eligió el análisis de metilación específica por PCR (MSP) por ser una técnica cualitativa ampliamente utilizada por su rapidez en la obtención de resultados y su bajo costo en comparación de otras tecnologías de análisis. Su fundamento radica en el diseño de oligonucleótidos que reconocen directamente sitios ricos en islas CpG cuyo ADN ha sido previamente tratado con bisulfito de sodio. El bisulfito de sodio es un agente reductor que al estar en contacto con el ADN tiene la capacidad de desaminar las citosinas, que pasarán a ser moléculas de uracilo. Sin embargo, el bisulfito no puede provocar esta transición en citosinas que estén metiladas, por lo que no serán modificadas (Figura 20). Se diseñan

dos pares de oligonucleótidos: uno que reconoce secuencias metiladas que fueron previamente tratadas con bisulfito de sodio y otro que es complementario a los sitios CpG que han sido modificados con bisulfito de sodio por su ausencia de metilación (Figura 21). Posterior a este diseño, se realizan PCRs cuyos productos son observados por geles de electroforesis. Si se obtiene una amplificación, es porque existió complementariedad de oligonucleótidos según sea el caso (M, metilado; U, no metilado) (Figura 21).

Para el análisis de metilación por MSP se eligieron aleatoriamente 6 muestras de cada grupo (RC y EP) y 3 de epitelio normal de cérvix. En la primera columna de la figura 31 se observa el resultado de las bandas correspondientes a la amplificación para el gen MFSD6 donde 86% del total de las muestras (13/15) está predominantemente no metiladas sin distinción entre grupos pese a que esperábamos por nuestro análisis en Access que el comportamiento fuera metilado al menos en el grupo EP. Al comparar estos resultados con el gráfico de metilación de la región promotora del gen MFSD6 (Figura 32), se observa que existe concordancia de la señal obtenida en los arreglos con resultado por MSP ya que se evaluó la metilación en una parte de la región promotora correspondiente a 147pb (enmarcada por el recuadro negro) en donde la mayoría de las señales dan valores de metilación por debajo de cero (no metilado). Para la figura 33 tenemos la comparación de los resultados de metilación por las dos técnicas de la región promotora de MFSD6. En a), B15 del grupo de RC tiene un valor de metilación por debajo de cero (hipometilación) que además se observa como amplificación del producto no metilado (U) en la imagen del producto de PCR. En b), B16 del grupo de EP también tiene un comportamiento hipometilado según el resultado por microarreglos y es congruente con lo observado por PCR al tan solo existir amplificación con el par de oligos para no metilado (U) y en c), CN45, una muestra de libre de displasia, presenta una señal muy cercana a cero sin poder determinar si hay ganancia o pérdida en la metilación aunque por MSP la amplificación es mayor para ADN no metilado.

El gen PAPSS2 (Figura 31, segunda columna), dentro del grupo RC presentó una frecuencia de metilación del 66% (4/6) en comparación con el no metilado que fue de 83%(5/6). Para este mismo gen pero en el grupo de EP, se observa 100% de

encontrarse metilado y un 83% no metilado por lo que no existe una clara tendencia a algún tipo de comportamiento (hemimetilado 5/6), sin embargo la frecuencia de metilación de las muestras perteneciente al grupo EP (100%) es mayor al del grupo RC (66%). La figura 34 representa el comportamiento de metilación a lo largo de la región promotora del gen PAPSS2 enmarcándose en un rectángulo negro aquella que corresponde a la región evaluada por MSP. Lo que se observa refleja como en esta ubicación no existe diferencia alguna en la metilación entre grupos y esta es muy cercana a cero lo que refiere que en los microarreglos el comportamiento fue mayoritariamente hemimetilado. Al analizar la figura 35 que corresponde a la comparación de los resultados de metilación de la región promotora del gen PAPSS2, para los tres grupos, las muestras ejemplificadas en a) B15, b) B13 y c) CN45 no hay una clara tendencia en la metilación por los microarreglos ya que la señal de los tres es muy cercana a cero en el gráfico de normalización y este comportamiento es coincidente con lo observado por MSP ya que en los tres casos hay una amplificación de ambos oligos determinando una región hemimetilada que no muestra diferencias entre grupos.

El gen ZCCHC13 (Figura 31, tercer columna) presentó una frecuencia de metilación en el grupo de RC del 66% (4/6) y de pérdida de metilación del 50%. En el grupo de EP este gen se encontró claramente metilado en el 100% de las muestras y no metilado en 2/6, observándose en este grupo una frecuencia mayor de metilación, sin embargo, cuando comparamos la metilación de las muestras tumorales (RC + EP) contra el grupo libre de neoplasia, la diferencia en la metilación es clara ya que en epitelio normal cervical no hay una presencia en la metilación de esa región suponiendo que este gen, en al menos esta región, tiene una metilación diferencial en muestras de cáncer cervical en comparación de epitelio normal. Al observar el gráfico de la figura 36, vemos claramente como este refleja el comportamiento obtenido por MSP enmarcado por el rectángulo negro señalando la región que fue analizada por esta técnica cuyo comportamiento es el visto por los arreglos. Por otra parte, en la figura 37, donde se esquematiza la comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas de análisis, en a) se tiene a B63 del grupo RC con una clara metilación de la región evaluada por presentar señales por arriba de cero en el gráfico normalizado que

además coincide con lo obtenido por MSP donde es clara la amplificación con los oligos para ADN metilado (M). En la misma figura, b) señala el comportamiento de metilación de la muestra B52 del grupo EP la cual presenta una importante metilación en la región señalada y que además corresponde a la amplificación por PCR de los oligos para ADN metilado (M). Por último, c) muestra la metilación en CN17 una muestra de epitelio normal cervical misma que no presenta una metilación significativa ni diferencial correspondiendo a lo observado por MSP donde se puede observar una amplificación ligera con ambos grupos de nucleótidos.

A partir de lo observado con nuestro análisis podemos reconocer las limitaciones de la técnica de MSP al tan solo evaluar la metilación cualitativamente de una pequeña región (100-200pb aproximadamente que posee de longitud el amplicón) reconociendo la dificultad para escalar la cantidad de información de metilación obtenida por los microarreglos de los que se obtienen un escaneo preciso del estado de metilación de regiones promotoras enriquecidas de CpG con una longitud de 800pb o más y el tamaño del amplicón que puede ser amplificado por MSP sin olvidar la heterogeneidad de las células neoplásicas que conforman un tejido tumoral. De este análisis también es posible determinar que los resultados obtenidos con el análisis de metilación por microarreglos fueron congruentes con los de MSP al comparar el producto de PCR con los gráficos normalizados dándole confianza y fidelidad a los datos extraídos del arreglo y validando nuestros resultados. Es importante reconocer que al realizar la comparación entre grupos se esperaba una hipermetilación en los promotores de los genes seleccionados (MFSD6, PAPSS2 y ZCCHC13) en la muestra EP según el análisis realizado en Access y no fue así en todos los casos por lo que para completar el objetivo de este estudio se decidió realizar un segundo análisis que nos determinara, con un valor significativo, promotores que se encontraran diferencialmente metilados en los distintos grupos.

Segundo análisis de resultados

Como se ha mencionado, dependiendo la dimensión del promotor será el número de sondas que evalúan la metilación en toda su longitud por lo que en este segundo

análisis se obtuvo el valor promedio de las señales de metilación a lo largo de la región promotora para establecer un comportamiento representativo del promotor de cada gen. Para tal análisis se decidió comparar el perfil de metilación entre dos grupos: tumoral vs normal y EP vs RC por lo que se decidió utilizar la prueba paramétrica t de Student útil para determinar si hay una diferencia significativa entre las medias de dos grupos que tienen una distribución normal. Para ambas comparaciones especificamos el nivel de la probabilidad α o nivel de significancia p que estamos dispuestos a aceptar como $p \leq 0.005$ (aceptada para analizar procesos biológicos) ya que existen 23 330 datos a comparar y cuanto mayor es la diferencia entre las dos medias, mayor es la probabilidad que exista una diferencia estadística significativa. Para complementar este análisis decidimos realizar la prueba de tasa de descubrimientos falsos (FDR, del inglés False Discovery Rate) que es un método estadístico utilizado cuando se presentan múltiples hipótesis para evitar hacer múltiples comparaciones.

Para la comparación del perfil de metilación de muestras tumorales vs epitelio normal se observó que de manera global existe una ganancia de metilación en regiones ricas en CpG que muestras tumorales (2 196 genes hipermetilados) y en menor proporción existen regiones con una importante pérdida en la metilación (3734 genes hipometilados) en muestras tumorales con respecto al epitelio normal. Estos resultados son visibles en el gráfico de de la figura 38 y se demuestran con el mapa de calor de la figura 37 y la gráfica del volcán de la figura 39. A lo largo de su extensión, el ADN genómico presenta regiones susceptibles de metilación que contribuyen a mantener los estados de compartimentalización o relajación de la cromatina.¹⁰³ Algunos de estas pueden situarse en promotores, intrones, regiones intergénicas, de alta frecuencia de repetidos etc. mismas que en el evento carcinogénico presentan una desregulación gradual tanto en pérdida de metilación (principalmente en oncogenes, sitios susceptibles a mutaciones) como de ganancia de metilación (en genes supresores de tumores).¹⁰⁴ Para evaluar el impacto en la posible ganancia de expresión de proteínas (hipometilación) y pérdida de la transcripción (hipermetilación) de los genes con una diferencia significativa en su metilación entre grupos, se investigó la función molecular y procesos biológicos en el que participan (Figura 41 y 42) destacando que las proteínas cuyo promotor se encuentra hipermetilado en los tumores participan como proteínas de

unión y con actividad catalítica cuya función molecular principal es la de participar en procesos metabólicos y de localización. Por otra parte, aquellos genes que se encuentran hipometilados en tejido tumoral corresponde a proteínas que una vez reactivada su transcripción en células neoplásicas puede favorecer la unión a otras proteínas, con actividad catalítica y reactivación de reguladores transcripcionales. Del total de 2196 genes que se encuentran hipermetilados en muestras tumorales y no lo están en tejido epitelial normal de cérvix encontramos a TIMP3 a quien Wisman y cols⁸¹ había encontrado hipermetilado con una frecuencia significativamente mayor en carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas en comparación con tejido normal cervical, además de que su inhibición por metilación se ha asociado como un evento característico de adenocarcinomas por Jeong y cols.⁹³ RASSF y RASSF7 en este análisis se encontraron hipermetiladas y también han sido descritas por presentar una frecuente metilación en su promotor en enfermedades como el neuroblastoma¹⁰⁵ Particularmente RASSF2 se propuso como un gen supresor por Guerrero y col.¹⁰² al observar su silenciamiento por hipermetilación en cáncer de mama, colorrectal, pulmón y cáncer cervical donde además se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad. Entre los genes importantes para la diferenciación celular encontramos a WNT9A cuya inactivación por metilación del ADN contribuye a la proliferación celular incontrolada¹⁰⁶, PAX8 es otro gen cuyo promotor se encuentra hipermetilado, donde estudios han reportado la presencia de su proteína por inmunohistoquímica en lesiones cervicales de bajo grado pero su ausencia en lesiones escamosas de alto grado y carcinomas¹⁰⁷ proponiendo nosotros un mecanismo de silenciamiento a través de la metilación del promotor. TERT es otro gen que en diversos estudios en líneas celulares de cáncer cervical y tumores de cérvix ha reportado una ganancia de metilación en la región promotora en comparación con epitelio normal¹⁰³ coincidiendo con lo obtenido en este estudio. Estos son algunos de los genes cuyos promotores se encontraron hipermetilados en este estudio en cáncer cervical y que coincide con lo reportado previamente en la literatura sin embargo siguen teniendo igual interés el restante número de genes que no están reportado y aún no se sabe su posible participación en el desarrollo de la neoplasia.

La segunda comparación se realizó entre los grupos tumorales EP vs RC para poder encontrar un perfil de metilación característico que nos dé información sobre la metilación en pacientes con un peor pronóstico de la enfermedad. Lo que se puede observar es que hay un mayor número de genes con promotores hipermetilados en el grupo EP (273) como se especifica en la tabla 17 y figura 43 con un valor de probabilidad menor o igual a 0.005, mismos que se determinan en el mapa de calor de la figura 44 y la grafica de volcán de la figura 45. En la búsqueda de la función molecular y proceso biológico en el que participan los genes que estuvieron diferencialmente metilados en esta comparación (Figura 46 y 47) se encontró que la gran mayoría de los genes que se encuentran hipermetilados en EP y no en RC participan en procesos metabólicos siendo su función molecular la de tener actividad catalítica, reguladores transcripcionales o proteínas de unión; funciones que se estarían perdiendo o se encontraría disminuida por su inactivación epigenética. Es importante mencionar que los 273 genes con promotores metilados en EP y no en RC no se ha reportado la participación de ninguno en la respuesta al tratamiento ni su participación en la carcinogénesis cervical.

La globalidad de nuestros resultados y la comparación del análisis de metilación con las metodologías utilizadas nos demuestra que las islas CpG pueden encontrarse en longitudes muy grandes que abarquen desde 2000 pb de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción hasta el primer intrón y exón del gen por lo que es posible observar distintos grados de metilación a lo largo de estas regiones, por lo que es deseable determinar la región dentro de los promotores que poseen una mayor importancia para el mecanismo de silenciamiento y reactivación de la transcripción de genes; aunado a esto, hay que recordar que la metilación es tan solo un mecanismo epigenético por el cual la célula puede reestructurar la compartimentalización de la cromatina sin dejar de lado las modificaciones postraduccionales en residuos de histonas, la actividad del complejo polycomb/tritorax, la regulación a través de mRNAs y la formación de territorios nucleares.

CONCLUSIONES

Utilizando herramientas y metodologías genómicas, se logró obtener el perfil de metilación global de 22 muestras tumorales de pacientes con cáncer cervical localmente avanzado y el de 4 muestras provenientes de epitelio normal de cérvix.

Un primer análisis de los datos de metilación, realizado con la herramienta de Access, determinó que los promotores de 37 genes se encontraban hipermetilados en una frecuencia del 100% de las muestras del grupo EP, no así en el grupo RC

Al evaluar por MSP la metilación en el promotor de tres genes arrojados en el primer análisis (MFSD6, PAPSS2 y ZCCHC13) se observó que tan solo ZCCHC13 se encontraba hipermetilado en las muestras tumorales (tanto en EP como RC) y no en las muestras libres de neoplasia. El anterior resultado nos llevó a realizar un segundo análisis.

En el segundo análisis de los datos de metilación utilizando el paquete estadístico R, se comparó el perfil de metilación de las muestras del grupo tumoral contra las del grupo normal. Se encontró que existen 2196 genes cuyas regiones promotoras se encuentran diferencialmente hipermetiladas y 3734 hipometiladas en el grupo tumoral con un valor de significancia $p \leq 0.005$.

Entre las regiones con diferencias significativas en la metilación en muestras tumorales, encontramos la región promotora de genes como TIMP3, MMP21, RASSF7, WNT9A, PAX8 y TERT que han sido previamente reportados en la literatura por estar hipermetilados en células provenientes de cáncer cérvico uterino, lesiones epiteliales de alto grado y carcinoma cervical.

En el segundo análisis, al comparar el perfil de metilación de los grupos tumorales de enfermedad progresiva (EP) con el grupo tumoral de respuesta completa (RC), se

observó un ganancia en la metilación en el grupo de peor pronóstico al presentar 273 regiones promotoras hipermetiladas y 23 hipometiladas significativamente. Los genes que de esta comparación resultaron estar diferencialmente metilados no han sido previamente reportados en la literatura

Se comprobó que existe una mayor frecuencia de metilación en pacientes con una mala respuesta al tratamiento en comparación con los de mejor pronóstico

Al comparar los resultados de los análisis de metilación obtenidos a partir de ambas metodologías (análisis de metilación por microarreglos y MSP) se obtuvo un resultado similar en todos los casos evaluados garantizando la credibilidad de nuestros datos y validando nuestro método de análisis.

Al observar la información obtenida por los métodos de análisis de metilación en este trabajo, podemos establecer que el análisis de metilación por microarreglos provee gran cantidad de información que refleja el comportamiento a lo largo de toda la región promotora, no así el análisis por MSP que además de ser cualitativa tienen la limitante de evaluar la metilación en una región pequeña de no más de 200pb siendo difícil escalar los resultados entre metodologías.

Debido a que las islas CpG pueden encontrarse en longitudes muy grandes se observan distintos grados de metilación a lo largo de estas regiones, por lo que es deseable determinar la región dentro del promotor que confiere mayor importancia al mecanismo de regulación a través de la metilación del ADN, evitando sesgar el análisis.

Este estudio, al ser descriptivo, provee de una gran cantidad de información que puede ser útil para distintos grupos de investigación ya que posee información general del grado de metilación en la globalidad de genoma de células tumorales de cáncer de cérvix localmente avanzado.

Al realizar un estudio detallado de vías que participan en Hallmarks del cáncer o proteínas que tienen actividad clave en el desarrollo de este cáncer podrán proponerse marcadores que sean reconocidos como iniciadores de la enfermedad y serán útiles para el diagnóstico temprano.

A partir de los resultados obtenidos en el segundo análisis de este trabajo, será posible proponer proteínas cuya transcripción se regula principalmente por el mecanismo de metilación que sirvan de marcadores pronósticos de la enfermedad previos estudios en líneas celulares radioresistentes.

Es deseable que genes seleccionados como diferencialmente metilados entre los distintos grupos se determine la metilación local por técnicas cuantitativas de análisis como lo es la modificación por bisulfito seguida de secuenciación.

Debido a la variación y extensa longitud que pueden presentar los promotores, es posible realizar un tercer análisis de los datos región por región utilizando el grafico DMR's que determinen la metilación por sonda.

BIBLIOGRAFÍA

¹ http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, Globocan 2012. International Agency for Reserarch on Cancer. World Health Organization. [fecha de última consulta mayo 2014].

² http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, Globocan 2012. International Agency for Reserarch on Cancer. World Health Organization [fecha de última consulta mayo 2014].

³ <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> Globocan 2012. International Agency for Reserarch on Cancer. World Health Organization [fecha de última consulta enero 2013].

⁴ Alameda, F. y Carreras R. (2008). *Histopatología, citopatología, inmunohistoquímica y determinación del virus del papiloma humano*. **3**. Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. Editorial panamericana. Buenos Aires; Madrid.

⁵ López, A. y Lizano, M. (2006) *Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina*. 31-55. Instituto Nacional de Cancerología.

⁶ Lorenzo, T. (2008). *Citología del tracto genital femenino y de la glándula mamaria*. **4** Citología cérvicovaginal. Publicaciones Vértice. Málaga, España.

⁷ DiSaia, P.J. (2002). *Oncología Ginecologica Clinica*. Sexta edición. Madrid, España.

⁸ Duenas, A., Cetina, L., Mariscal, I., de la Garza, J. (2003). Modern management of locally advanced cervical carcinoma. *Cancer Treat Rev.* **29**, 389-399.

⁹ Pecorelli, S., Zigliani, L., Odicino F. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet.* **105**(2):107-108.

-
- ¹⁰ Poncei, J. y Martí, M. D. (2008). *Estadificación del cáncer de cuello de útero*. **7** Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. Editorial panamericana.
- ¹¹ Montalvo. (2011). Oncogía: *Cáncer Cervicouterino*. *Cancerología* **6**, 61 - 69
- ¹² Viswanathan, A., Lee, H., Hanson, E., Berkowitz, R. y Crum, C. (2006). Influence of margin status and radiation on recurrence after radical hysterectomy in Stage IB cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **65(5)**: 1501-1507.
- ¹³ Zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W. y Bornkamm, G. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer.* **13**, 650–656.
- ¹⁴ Meisels, A. y Fortin, R. (1976). Condylomatous lesions of the cervix and vagina.I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* **20**, 505–509.
- ¹⁵ Meisels, A. (1981). Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol.* **25**, 7–16.
- ¹⁶ Zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. Papillomaviruses inhuman cancers. *Proc.Assoc. Am. Physicians.* **111**, 581 – 587.
- ¹⁷ de Villiers, E. y Zur Hausen, H. (1981). Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.* **40**, 932-935.
- ¹⁸ Zur Hausen H. (1982). Human genital cancer; synergism between two virus infections and/or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet II.* 1370–1372.
- ¹⁹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>

-
- ²⁰ Prendiville, W. y Davies, P. HPV handbook 1: Human papillomavirus and cervical cancer. Taylor & Francis Group.
- ²¹ de Villiers, E., Fauquet, C., Broker, T., Bernard, H. y Zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**, 17-27.
- ²² Muñoz, N., Bosch, FX., de San José, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K., Snijders, P. y Meijer, C. (2003). International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J Med.* **348**, 518-527.
- ²³ Doorbar, J., Ely, S. y Sterling, J. (1991). Specific interaction between HPV 16 E1 - E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature.* **352**, 824-827.
- ²⁴ Petti, L., Nilson, L. y Dimaio, D. (1991). Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *EMBO J.* **10**, 845-855.
- ²⁵ Cary, A. y Laimonis, A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer.* **10**, 550-560.
- ²⁶ Dyson, N., Howley, P., Munger, K. y Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* **243**, 934-937.
- ²⁷ Mantovanif, I. (2001). The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* **20**, 7874-7887.

-
- ²⁸ Day, P., Lowy, D. y Schiller, J. (2003). Papillomavirus infect cells via a clathrin dependent pathway. *Virology*. **307**, 1-11.
- ²⁹ Ciaran, B., Woodman, S. y Lawrence, S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved tissues. *Cancer Nature Reviews*. **7**, 11-22.
- ³⁰ Sherman, L., Jackman, A. y Itzhaki, H. (1997). Inhibition of serum and calcium induced differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6 oncoprotein: role of P53 inactivation. *Virology*. **237**, 296-306.
- ³¹ Dueñas, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C. y Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic Perspectives. *Molecular Cancer*. **4**, 38, 1-24.
- ³² Hahn, W., Counter, C., Lundberg, A., Beijersbergen, R., Brooks, M. y Weinberg, R. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. **400**, 464-468.
- ³³ Hanahan, D. y Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646–674.
- ³⁴ Lopez, J., Percharde, M., Coley, H., Webb, A. y Crook, T. (2009). The context and potential of epigenetics in oncology. *British Journal of Cancer*. **100**, 571-577.
- ³⁵ Garber, K. (2006). Momentum building for human epigenome project. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 84-86.
- ³⁶ Higgins, M., Claremont, M., Major, J., Sander, C. y Lash, A. (2007). Cancer Genes: a gene selection resource for cancer genome projects. *Nucleic Acids Res.* **35**, 721-726.

-
- ³⁷ Jones, P. y Martienssen, R. (2005) A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR. *Cancer Res.*15; 65(24): 11241-11246.
- ³⁸ Waddington, CH. (1939) Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of drosophila. *Proc Natl Acad.* 25 (7): 299-307.
- ³⁹ Esteller, M. (2008). Molecular Origins of Cancer Epigenetics in Cancer. *Ph.D. Engl J. Med.* **358**, 1148-1159.
- ⁴⁰ Dawson, M. y Kouzarides, T. (2012). Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell.* **150**, 12-27.
- ⁴¹ Herman, J. y Baylin, S. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* **349**:2042-2054.
- ⁴² Li, E., Bestor, T. y Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* **69**, 915–926.
- ⁴³ Okano, M., Bell, D., Haber, D. y Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* **99**, 247-257.
- ⁴⁴ Herranz, M. y Esteller, M. (2005). CpG Island Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Human Cancer: Concepts, Methodologies and Uses. *DNA Methylation and Cancer Therapy.*
- ⁴⁵ Gardiner, M. y Frommer M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 196(2):261-282.

-
- ⁴⁶ Venter, J., Adams, M., Myers, E., Li, P., Mural, R. y Sutton, G. (2001). The sequence of the human genome. *Scienc.* **291**, 1304-1351.
- ⁴⁷ Lander, E., Linton, L. y Birren, B. (2001) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* **409**, 860-921.
- ⁴⁸ Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- ⁴⁹ Feinberg, A., Cui, H. y Ohlsson, R. (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol.* **12**, 389-1398.
- ⁵⁰ Reik, W. y Lewis, A. (2005). Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet.* **6**, 403-410.
- ⁵¹ Peter, A. y Stephen, B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell.* **128**, 683-692.
- ⁵² Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* **8**, 286-298.
- ⁵³ Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. y Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* **300**, 455.
- ⁵⁴ Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Rev. Cancer.* **2**, 342-350.
- ⁵⁵ Lopez, J., Percharde, M., Coley, H., Webb, A. y Crook, T. (2009). The context and potential of epigenetics in oncology. *British Journal of Cancer.* **100**, 571- 577.

-
- ⁵⁶ Baylin, S. (2002). Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol.* **12**, 331-337.
- ⁵⁷ Feinberg, A. y Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**, 143-153.
- ⁵⁸ Baylin, S., Herman, J., Graff, J., Vertino, P. y Issa, J. (1998). Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* **72**, 141-196.
- ⁵⁹ Costello, J., Fruhwald, M., Smiraglia, D., Rush, L., Robertson, G., Gao, X., Wright, F.; Feramisco, J., Peltomaki, P. y Lang, J., (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* **24**, 132-138.
- ⁶⁰ Szalmas, A. y Konya, J. (2009). Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, **19**, 144-152.
- ⁶¹ Wentzensen, N., Sherman, M. y Schiffman, M. (2009). Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state of the science. *Gynecol Oncol.* **112**, 293-299.
- ⁶² de Capoa, A., Della, R., Caiafa, P., Mariani, L., Del Nonno, F., Vocaturo, A., Donnorso, R., Niveleau, A. y Grappelli, C. (2003). DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep.* **10**, 545-549.
- ⁶³ Piyathilake, C., Celedonio, J., Macaluso, M., Bell, W., Azrad, M. y Grizzle, W. (2008). Mandatory fortification with folic acid in the United States is associated with increased expression of DNA methyltransferase-1 in the cervix. *Nutrition.* **24**, 94-99.

-
- ⁶⁴ Wisman, G., Nijhuis, E., Hoque, M., Reesink-Peters, N., Koning, A., Volders, H., Buikema, H., Boezen, H., Hollema, H., Schuurung, E., Sidransky, D. y van der Zee, A. (2006). Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer*. **119**, 1908-1914.
- ⁶⁵ Kitkumthorn, N., Yanatatsanajit, P., Kiatpongsan, S., Phokaew, C., Triratanachat, S., Trivijitsilp, P., Termrungruanglert, W., Tresukosol, D., Niruthisard, S. y Mutirangura, A. (2006). Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. *BMC Cancer*. **6**, 55-63.
- ⁶⁶ Iliopoulos, D., Oikonomou, P., Messinis, I. y Tsezou, A. (2009). Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. *Oncol Rep*. **22**, 199-204.
- ⁶⁷ Lin, Z., Gao, M., Zhang, X., Kim, Y., Lee, E., Kim, H. y Kim I. (2005). The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. *J Cancer Res Clin Oncol*. **131**, 364-370.
- ⁶⁸ Liu, S., Leung, R., Chan, K., Chiu, P., Cheung, A., Tam, K., Wong, L. y Ngan, H. (2004). p73 expression is associated with the cellular radiosensitivity in cervical cancer after radiotherapy. *Clin Cancer Res*. **10**, 3309-3316.
- ⁶⁹ Martinez, B., Melendez, B., Cuadros, M., Garcia, M., Nomdedeu, J., Rivas, C., Fernandez, J. y Benitez, J. (2002). Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or LOH in non-Hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer*. **102**, 15-19.
- ⁷⁰ Garcia, G., Bueso, C., Daniel, J., Williamson, J., Kantarjian, H. y Issa, J. (2002). DNA methylation patterns at relapse in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. **8**, 1897-1903.

-
- ⁷¹ Kuzmin, I., Liu, L., Dammann, R., Geil, L., Stanbridge, E. y Wilczynski, S. (2003). Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res.* **63**, 1888-1893.
- ⁷² Yang, H., Liu, V., Wang, Y., Tsang, P. y Ngan, H. (2006). Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer.* **6**, 212-224.
- ⁷³ Cheung, T., Lo, K., Yim, S., Chan, L., Heung, M. y Chan, C. (2004). Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* **93**, 621-627.
- ⁷⁴ Narayan, G., Arias, H., Koul, S., Vargas, H., Zhang, F. y Vilella, J. (2003). Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer.* **2**, 24.
- ⁷⁵ Jeong, D., Youm, M., Kim, Y., Lee, K., Sung, M. y Yoon, H. (2006). Promoter methylation of p16, DAPK, CDH1, and TIMP-3 genes in cervical cancer: correlation with clinicopathologic characteristics. *Int J Gynecol Cancer.* **16**, 1234-1240.
- ⁷⁶ Ivanova, T., Vinokurova, S., Petrenko, A., Eshilev, E., Solovyova, N. y Kisseljov, F. (2004). Frequent hypermethylation of 5' flanking region of TIMP-2 gene in cervical cancer. *Int J Cancer.* **108**, 882-886.
- ⁷⁷ Overmeer, R., Henken, F. y Snijders, P. (2008). Association between dense CADM1 promoter methylation and reduced protein expression in high grade CIN and cervical SCC. *J Pathol.* **215**, 388-397.
- ⁷⁸ Overmeer, R., Louwers, J. y Meijer, C. (2011). Combined CADM1 and MAL promoter methylation analysis to detect premalignant cervical lesions in high risk HPV positive women. *Int J Cancer.* **129**, 2218-2225.

-
- ⁷⁹ Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., Lieber, A. y Kiviat, N. (2006). Discovery of Novel Methylation Biomarkers in Cervical Carcinoma by Global Demethylation and Microarray Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **15**(1):114-123.
- ⁸⁰ Shivapurkar, N., Sherman, M., Stastny, V., Echebiri, C., Rader, J., Nayar, R., Bonfiglio, T., Gazdar, A. y Wang, S. (2007). Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplásica. *Gynecologic Oncology.* **107**, 549-553.
- ⁸¹ Elaine H. Lim., Shi Len Ng., Jia Liang Li., Alexander R. Chang., Joseph Ng A., Jeffrey Low., Swee Chong Quek. y Eng Hseon Tay (2010). Cervical dysplasia: Assessing methylation status (Methylight) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFPI2 to improve diagnostic accuracy. *Gynecologic Oncology.* **119**, 225-231.
- ⁸² Lendvai, A., Johannes, F., Grimm, C., Eijnsink, J., Wardenaar, R., Volders, H., Klip, H., Hollema, H., Jansen, J., Schuurung, E., Wisman, B. y Van der Zee, A. (2012). Genome-wide methylation profiling identifies hypermethylated biomarkers in high-grade cervical intraepithelial neoplasia Epigenetics. *Landes Bioscience.* **7**(11), 1268-1278.
- ⁸³ Woong-Sun Kang., Sung Bum Cho., Jun-Soo Park., Moo-yul Lee., Soon-Chul Myung., Won Yong Kim., Hoon Lee., Dong-Ho Kim., Eun-Ju Lee. (2013). Clinico-epigenetic combination including quantitative methylation value of DKK3 augments survival prediction of the patient with cervical cáncer. *J Cancer Res Clin Oncol.* **139**, 97-106.
- ⁸⁴ Guerrero, D., Pérez, N., Blanco, L., Ojer, A., Cambra, K., Berdasco, M., Esteller, M., Maria, S., Torrea, N. y Guarch, R. (2013). RASSF2 hypermethylation is present and related to shorter survival in squamous cervical cancer. *Modern Pathology.* **26**, 1111-1122.

-
- ⁸⁵ Wentzensen, N., Sherman, M., Schiffman, M. y Wang, S. (2009). Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: Appraisal of the state-of-the-science. *Gynecologic Oncology*. **112**, 293-299.
- ⁸⁶ PubMeth: a cancer methylation database combining text-mining and expert annotation. *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, Database issue.
- ⁸⁷ Roossink, F., de Jong, S., Wisman, B., Van der Zee, A. y Schuurin, E. (2012). DNA hypermethylation biomarkers to predict response to cisplatin treatment, radiotherapy or chemoradiation: the present state of art. *Cell Oncol*. **35**, 231-241.
- ⁸⁸ Pfister, S., Schlaeger, C., Mendrzyk, F., Wittmann, A., Benner, A., Kulozik, A., Scheurlen, W., Radlwimmer, B. y Lichter, P. (2007). Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Research*. **35** (7), 51-63.
- ⁸⁹ Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera edición. CSHL Press. USA.
- ⁹⁰ de Huang, R., Chang, C., Su, P., Chen, Y. y Liao, Y. (2012). Methylomic Analysis Identifies Frequent DNA Methylation of Zinc Finger Protein 582 (ZNF582) in Cervical Neoplasms. *PLoS ONE*. **7**, 1-9
- ⁹¹ <http://genome.ucsc.edu/> UCSC Genome Bioinformatics. Genome Bioinformatics Group, University of California. [última consulta, junio 2013].
- ⁹² Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002. **18**(11)1427-1431.

-
- ⁹³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [última consulta, junio 2013].
- ⁹⁴ <http://omim.org/entry/606350>. Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University [última consulta, junio 2013].
- ⁹⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/81575>. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [última consulta, junio 2013].
- ⁹⁶ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5272>. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [última consulta, junio 2013].
- ⁹⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/440854>. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [última consulta, junio 2013].
- ⁹⁸ Cunningham, C., Dunlop, M., Wyllie, A. y Bird, C. (1993). Deletion mapping in colorectal cancer of a putative tumour suppressor gene in 8p22-p21.3. *Oncogene*. 8(5),1391-1396.
- ⁹⁹ Cicek, M., Koestler, D., Fridley, B., Kalli, K., Armasu, S., Larson, M., Wang, C., Winham, S., Vierkant, R., Rider, D., Block, M., Klotzle, B., Konecny, G., Winterhoff, B., Hamidi, H., Shridhar, V., Fan, J., Visscher, D., Olson, J., Hartmann, L., Bibikova, M., Chien, J. y Cunningham, J. (2013). Epigenome-wide ovarian cancer analysis identifies a methylation profile differentiating clear-cell histology with epigenetic silencing of the HERG K⁺ channel. *Hum Mol Genet*. 22(15): 3038-3047.
- ¹⁰⁰ Yamada, K., Ogata-Kawata, H., Matsuura, K., Kagawa, N., Takagi, K., Asano, K., Haneishi, A. y Miyamoto, K. (2009). ZHX2 and ZHX3 repress cancer markers in normal hepatocytes. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 1(14): 3724-3732.

-
- ¹⁰¹ Peters, C., Rees, J., Hardwick, R., Hardwick, J., Vowler, S., Ong, C., Zhang, C., Save, V., O'Donovan, M., Rassi, D., Alderson, D., Caldas, C., Fitzgerald, R. (2010). A 4-gene signature predicts survival of patients with resected adenocarcinoma of the esophagus, junction, and gastric cardia. *Oesophageal Cancer Clinical and Molecular Stratification (OCCAMS) Study Group Gastroenterology*. 139(6):1995-2004.
- ¹⁰² Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A., Szabó, G., Rual, J., Fisk, C., Li, N., Smolyar, A., Hill, D., Barabási, A., Vidal, M. y Zoghbi, H. (2006). A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell*. 125(4), 801-814.
- ¹⁰³ Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports*. 3(9): 2-6.
- ¹⁰⁴ Feinberg, A. y Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature cancer Reviews*. 4, 143-153.
- ¹⁰⁵ Djos, A., Martinsson, T., Kogner, P. y Carén, H. (2012). The RASSF gene family members RASSF5, RASSF6 and RASSF7 show frequent DNA methylation in neuroblastoma. *Mol Cancer*. 13(11): 40, 1-13.
- ¹⁰⁶ Xiang, Y., Lin, G., Zhang, Q., Tan, Y. y Lu, G. (2008). Knocking down Wnt9a mRNA levels increases cellular proliferation. *Mol Biol Rep*. 35(2): 73-79.
- ¹⁰⁷ Shukla, A., Thomas, D. y Roh, M. (2013). PAX8 and PAX2 expression in endocervical adenocarcinoma in situ and high-grade squamous dysplasia. *Int J Gynecol Pathol*. 32(1): 116-121.