



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**PERFIL DE METILACIÓN DE LOS GENES *HOX* Y SU ASOCIACIÓN  
CON LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CÁNCER CÉRVICO  
UTERINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
PRESENTA:

**MAGDALENA RÍOS ROMERO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**COMITÉ TUTOR: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015**



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 el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de abril de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **RIOS ROMERO MAGDALENA** con número de cuenta **304625231**, con la tesis titulada **"PERFIL DE METILACIÓN DE LOS GENES HOX Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA A TRATAMIENTO EN CÁNCER CÉRVICO UTERINO"**, realizada bajo la dirección del **DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA**:

Presidente: DRA. SARA HUERTA YEPEZ  
Vocal: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO  
Secretario: DRA. PATRICIA PIÑA SÁNCHEZ  
Suplente: M. EN C. ÓSCAR GERARDO ARRIETA RODRÍGUEZ  
Suplente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN

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

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de junio de 2015

*M del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgar la beca no. 480751/282036.

A mi tutor:

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Y Comité Tutorial:

Dra. Patricia Piña Sánchez

Dra. Marcela Lizano Soberón

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por otorgar el financiamiento para la realización del presente trabajo.

Registro: R-2006-3602-5

Financiamiento: FIS/IMSS/PROT/G13/1234.

# INDICE

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	ii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Cáncer cérvico uterino.....	3
Epidemiología.....	3
Desarrollo e histopatología.....	3
Virus de Papiloma Humano.....	4
Estructura.....	5
Coinfecciones.....	7
Aspectos clínicos del CACU.....	8
Tratamiento.....	9
Seguimiento y respuesta a tratamiento.....	10
Factores que influyen en la respuesta a tratamiento y biomarcadores.....	11
Biomarcadores de pronóstico y respuesta.....	12
p-AKT.....	12
COX-2.....	12
NOS.....	13
HIF-1 $\alpha$ .....	13
VEGF.....	14
EGFR.....	14
SSC-Ag.....	14
Nuevas opciones de tratamiento: Terapias epigenéticas.....	15
Epigenética.....	16
Metilación del DNA.....	16
Alteraciones de la metilación en CACU y posibles marcadores.....	18
Marcadores de metilación y respuesta a tratamiento en CACU.....	23
Los genes <i>HOX</i> como marcadores epigenéticos.....	23
Familia de genes <i>HOX</i> .....	23
Estructura y función general de los genes <i>HOX</i> .....	25
Regulación transcripcional de los genes <i>HOX</i> .....	27
Remodelación de la cromatina por dominios nucleares.....	27
Modificaciones locales de marcas de histonas.....	28
Metilación del DNA.....	30
Regulación mediada por ncRNAs.....	31
Alteraciones en la metilación y expresión de los genes <i>HOX</i> en cáncer.....	31
Antecedentes.....	33
Justificación.....	34
Planteamiento del problema.....	35
Hipótesis.....	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos.....	36
Material y métodos.....	36
Muestras biológicas y criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	36

Extracción de DNA y control de calidad .....	37
Genotipificación de VPH .....	37
Determinación del perfil de metilación de los genes <i>HOX</i> .....	39
Análisis de datos.....	40
Resultados .....	40
Discusión.....	51
Conclusión.....	57
Perspectivas.....	58
Literatura citada.....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del epitelio escamoso del cérvix uterino y las alteraciones histológicas encontradas en Lesiones precursoras y CACU.....	4
Figura 2. Estructura del genoma de VPH16.....	6
Figura 3. Mecanismos de activación/inactivación transcripcional mediada por la metilación de islas CpG.....	17
Figura 4. La familia de genes <i>HOX</i> y su agrupación genómica en clusters.....	24
Figura 5. Estructura general de los genes y las proteínas <i>HOX</i> .....	26
Figura 6. Electroforesis de DNA total obtenido a partir de muestras de pacientes con CACU.....	42
Figura 7. Frecuencia de tipos de VPH en las muestras analizadas.....	43
Figura 8. Análisis de Differential Score en las muestras de buena y mala respuesta a tratamiento.....	44
Figura 9. Niveles de metilación en las islas CpG de los genes <i>HOX</i> en los grupos de buena y mala respuesta.....	45
Figura 10. Agrupamiento jerárquico no supervisado de las muestras de CACU.....	46
Figura 11. Esquema de la localización genómica analizada en el presente Estudio.....	47
Figura 12. Sobrevida global de las pacientes con CACU en relación al estado de metilación de los genes <i>HOX</i> .....	48
Figura 13. Genes <i>HOX</i> diferencialmente expresados en la progresión de CACU y diferencialmente metilados en la respuesta a tratamiento.....	58

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del CACU según la FIGO.....	8
Tabla 2. Metodologías para el análisis de metilación del DNA.....	19
Tabla 3. Genes frecuentemente metilados en CACU.....	21
Tabla 4. Características clínicas generales de la población evaluada.....	41
Tabla 5. Posiciones genómicas, regiones y estructuras analizadas.....	49
Tabla 6. Asociación del perfil de metilación de los <i>loci HOX</i> con variables clínicas.....	50

## RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino (CACU) es un problema de salud pública en nuestro país. La quimio y radioterapia continúan siendo los tratamientos de primera línea para el CACU. Se ha evaluado el beneficio de los esquemas terapéuticos de radio y quimioterapia concomitante, los cuales aumentan la sobrevida de las pacientes, sin embargo, solamente el 50% de éstas responde a la terapia. Numerosos autores han propuesto que las marcas epigenéticas, particularmente la metilación del DNA, podrían funcionar como biomarcadores de pronóstico clínico o de respuesta a terapia, ya que en la actualidad, no se cuenta con un marcador molecular predictivo en CACU.

Por otro lado, la familia de factores de transcripción *HOX*, involucrados en procesos de diferenciación y proliferación, presenta numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas en diversos tipos de cáncer, por lo que se sugieren como buenos biomarcadores de pronóstico clínico. Poco se ha descrito sobre las alteraciones epigenéticas de los genes *HOX* en CACU, por lo que el objetivo de este trabajo es analizar el estado de metilación de los 39 *loci HOX* y su asociación a la sobrevida en pacientes con CACU localmente avanzado. Para ello, se utilizaron 22 muestras de DNA de pacientes con CACU (IIB-IIIB) y se hibridaron en microarreglos para el análisis de metilación en todo el genoma (Infinium Human Methylation 450, Illumina®), enfocando el análisis a los 39 *loci HOX*. La hipermetilación de los genes *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXC6*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD12* y *HOXD13* se asocia con una mala respuesta a tratamiento en pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas. Las pacientes que presentan hipermetilación de los genes *HOXB4*, *HOXB13*, *HOXC4-C6* y *HOXD12* tienen una sobrevida global menor (38%), comparada con las pacientes que presentan hipometilación en estos genes (76%). Es necesario evaluar de manera específica dichos promotores en un número mayor de muestras para determinar si el perfil de metilación es un buen marcador pronóstico en dichas pacientes.

## ABSTRACT

Cervical cancer is a major health problem in Mexico. Chemotherapy and radiotherapy are still the first line treatments for these patients, and their concomitant effects have been evaluated on the increase of overall survival, however, only 50% of the patients respond to these therapies. Several authors have suggested that epigenetic marks, particularly DNA methylation, might function as biomarkers for clinical prognosis or therapy response. To date, a molecular marker for response to treatment in cervical cancer is still lacking.

It has been reported that the *HOX* genes, which are a family of transcription factors involved in differentiation and proliferation, show numerous genetic and epigenetic alterations in cervical cancer. Various global methylation studies suggest that *HOX* genes can function as biomarkers for clinical prognosis in some cancers.

The aim of this study is to determine whether the methylation status of the 39 *HOX* gene promoters is associated with response to therapy in patients with squamous cervical cancer. DNA samples from 22 patients with cervical cancer were (stages IIB -IIIB) hybridized to whole genome methylation arrays (450 Infinium Human Methylation Illumina®) and the analysis was focused on the promoters of 39 *HOX* genes.

*HOXB2, HOXB3, HOXB13, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXD3, HOXD4, HOXD9, HOXD10, HOXD12* and *HOXD13* hypermethylation is associated with a poor treatment response in locally advanced cervical cancer patients. Patients with *HOXB4, HOXB13, HOXC4-C6* y *HOXD12* hypermethylation have a lower overall survival (38 %) compared with patients with hypomethylation in these genes (76%). This methylation profile may be used as a prognostic marker in locally advanced cervical cancer patients.

## **INTRODUCCIÓN**

### **CÁNCER CERVICO UTERINO**

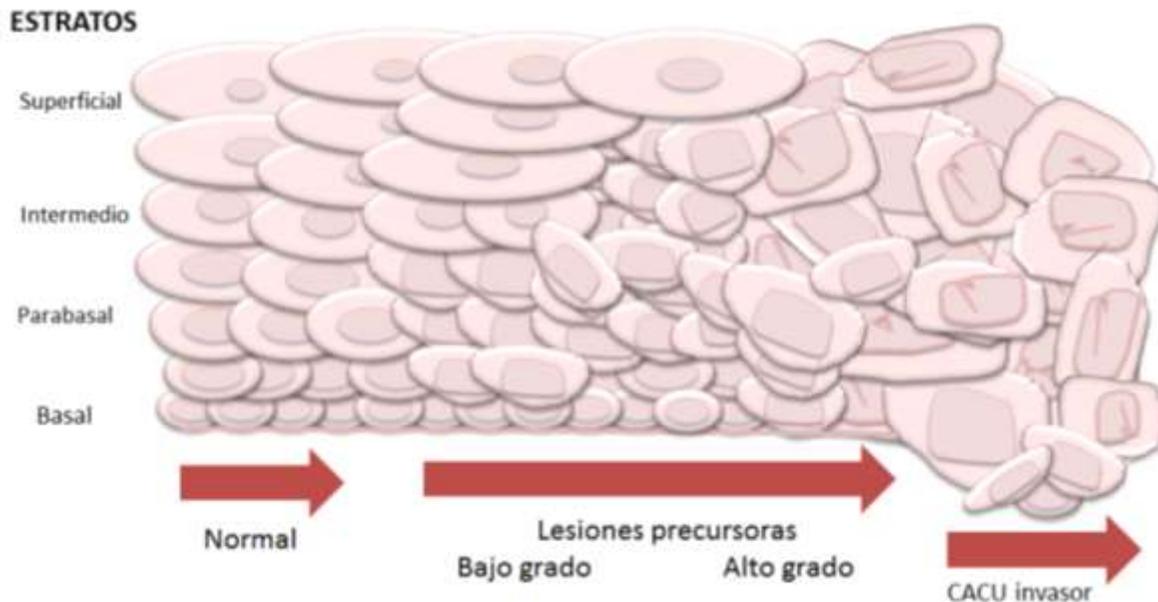
#### **Epidemiología**

El cáncer cérvico uterino (CACU), es la segunda neoplasia más frecuente en mujeres a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2008), con una incidencia de 15.3 casos por cada 100,000 mujeres. El CACU es la tercera causa de muerte en la mujer por neoplasias malignas, con una mortalidad de 76160 casos por cada 100,000 mujeres (GLOBOCAN, 2012). En México, el CACU continúa siendo un problema de salud pública, ya que ocupa el segundo lugar en incidencia en mujeres (13960 casos por cada 100,000); y la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres (4769 casos por 100, 000 mujeres) (GLOBOCAN, 2012). El 62% de los casos de CACU corresponden a carcinoma in situ y 38% de carcinoma invasor. El 1.7% de muertes por cáncer se deben al CACU (INEGI, 2009).

#### **Desarrollo e histopatología**

El CACU es precedido de lesiones pre-neoplásicas conocidas como lesiones epiteliales escamosas de bajo grado (LEBG) y lesiones epiteliales escamosas de alto grado (LIEAG), según la clasificación de Bethesda, o Neoplasia intraepitelial grado I, II y III según clasificación de Richard. El equivalente de las LEBG son las NIC I y de las LEAG las NIC II y III (Solomon, 2002).

La IARC (2009) enumera dos tipos principales de carcinomas uterinos: los carcinomas escamosos o epidermoides, que provienen del epitelio escamoso (aproximadamente 80% de los casos) y los adenocarcinomas, que provienen del epitelio columnar (19% de los casos). Existen otros tipos histopatológicos, como el adenocarcinoma escamoso, neuroendócrino y tumores no diferenciados.



**Figura 1. Esquema del epitelio escamoso del cérvix uterino y las alteraciones histológicas encontradas en Lesiones precursoras y CACU.** Se muestran los estratos del epitelio (superficial, intermedio, parabasal y basal) y la arquitectura que presentarían bajo condiciones fisiológicamente sanas; en caso de una lesión precursora de bajo y alto grado; y CACU.

### **Virus de Papiloma Humano**

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es un virus de DNA de doble cadena y sin envoltura que infecta principalmente epitelios cutáneos (como por ejemplo, VPH6 y 11) y mucosos (como VPH16 Y 18). La infección por Virus Papiloma Humano (VPH) es el principal factor etiológico asociado con el desarrollo de CACU, ya que se ha detectado en más del 99% de los casos (Walboomers, *et al.*, 1999). Se ha establecido que la zona de transformación del cérvix es el blanco de infección del VPH, generando como resultado una verruga o papila. En la mayoría de las mujeres inmunocompetentes, la infección puede resolverse dentro de los primeros 6 meses; sin embargo, si la infección es persistente, el riesgo de desarrollar una lesión aumenta (Chua y Hjerpe, 1996).

En México, la prevalencia de infección de VPH es de 14.5% y es dependiente de la edad. En mujeres jóvenes (25 años o menos) la prevalencia de VPH es mayor

(16.7%), mientras que en mujeres de 35 a 44 años, la prevalencia declina. Se observa un segundo pico en la prevalencia en mujeres de 45 años o más (12.3%) (Lazcano-Ponce *et al.*, 2001).

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*. Esta familia contiene 16 géneros, de los cuales el género alfa contiene a los virus que infectan a los epitelios humanos; a su vez, el género alfa contiene 15 especies, las cuales se subdividen en tipos virales y variantes intratipo de acuerdo a la homología en la secuencia del gen L1 (gen que codifica la proteína mayor de la cápside) (Buck *et al.*, 2013).

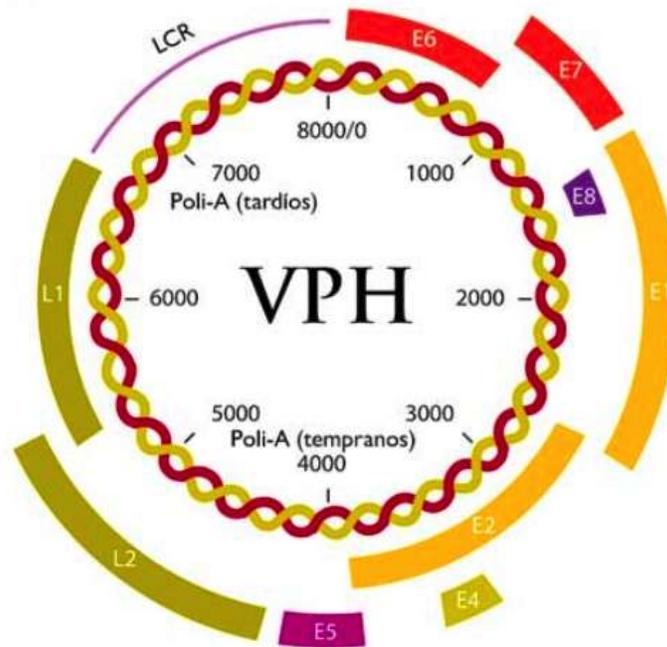
## **Estructura**

La mayoría de los tipos de VPH comparten una estructura genética común (figura 2). Su genoma está dividido en aproximadamente ocho marcos de lectura abiertos, que se dividen en tres partes funcionales: una región de control larga (LCR), en donde se encuentran los elementos regulatorios necesarios para la expresión de los genes virales y para su replicación; una región temprana (E1-E7), cuyos productos proteicos son necesarios para la replicación viral; y finalmente una región tardía (L1-L2), en donde se codifican las proteínas estructurales del virus.

La proteína E1 reconoce el sitio de inicio de la replicación, y funciona como helicasa, permitiendo la replicación del genoma viral. E2 es un factor de transcripción que controla la expresión de los genes virales, sea a la alta o a la baja. E4 es una proteína necesaria para la replicación del genoma viral y regula la síntesis y liberación de las partículas virales (Doorbar, 2013). E5 es una proteína transmembranal que modula la actividad de proteínas celulares (como cinasas citoplasmáticas y cinasas transmembranales) para promover la replicación viral (DiMaio y Petti, 2013).

Las proteínas E6 y E7 son conocidas como “oncoproteínas virales” debido a su actividad transformante en células epiteliales. E6 secuestra (y en algunos casos induce la degradación) de múltiples blancos celulares, entre ellos la proteína p53. E7 secuestra y/o induce degradación de la proteína Rb, entre otros blancos. La

inhibición de estas proteínas celulares (entre otros mecanismos) ha sido asociada con la oncogenicidad de algunos tipos de VPH (Roman y Munger, 2013; Vande Pol y Klingelutz, 2013).



**Figura 2. Estructura del genoma de VPH16.** Se señala la LCR, que contiene elementos regulatorios para el control de la expresión génica del virus. Los genes Early se presentan en amarillo y morado. Las oncoproteínas virales se presentan en rojo. Tomado de: López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2002.

L1 y L2 son las proteínas estructurales mayor y menor de la cápside, respectivamente. Ambas forman el esqueleto icosaédrico de 55 a 60 nm de extensión que caracteriza al VPH. Cada virus contiene 360 proteínas L1, que se ensamblan en capsómeros con 5 moléculas L1 cada una. En total, el virus contiene 72 capsómeros. Se ha estimado, además, que cada virus contiene hasta 72 proteínas L2 en la cápside. Ambas proteínas participan en el reconocimiento intra y extracelular, así como en el empaquetamiento del genoma viral (Wang y Roden, 2013).

Actualmente se conocen 170 tipos virales, de los cuales 12 son considerados carcinógenos por la IARC (2009), o de alto riesgo: VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59. Los tipos virales más frecuentes en CACU son VPH16 y VPH18, los cuales se presentan en 50 y 20% de los casos respectivamente (Bosch, 2008); aunque los estudios realizados en México son concordantes con un bajo porcentaje de VPH18 (5%-9%), respecto al mundial reportado (Piña *et al.*, 2006; Illades-Aguilar *et al.*, 2009). Vale la pena mencionar que la detección y genotipificación varía de acuerdo al método empleado.

### **Co infecciones**

Se define como coinfección a la presencia de dos o más tipos virales de VPH (o VPH con otros virus/microorganismos) en una muestra biológica. Las pacientes infectadas con un tipo viral de alto riesgo presentan un incremento en la probabilidad de adquirir un segundo tipo viral (Thomas *et al.*, 2000; Rousseau *et al.*, 2001). La adquisición de múltiples tipos se ha relacionado con un aumento en la persistencia viral y, por lo tanto, con la progresión de las lesiones precursoras y carcinogénesis (Perovic *et al.*, 2003). Sin embargo, existe controversia en el papel que juegan las coinfecciones en la sobrevida y pronóstico clínico de las pacientes. Un estudio demostró que las pacientes con tumores de CACU que presentan VPH16 en coinfección con VPH34, tienen una menor probabilidad de metástasis a nódulos linfáticos, comparadas con las pacientes que presentan VPH16 en infección única (Michimata, *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que en tumores establecidos, las coinfecciones de VPH16 con algún tipo viral de bajo riesgo tienen un impacto positivo en el pronóstico de las pacientes.

## Aspectos clínicos del CACU

El factor más importante para el pronóstico de las pacientes diagnosticadas con CACU es la etapa clínica. La Federación Internacional de Gineco-obstetricia (FIGO) clasifica a los tumores del cérvix uterino básicamente por la extensión anatómica de la enfermedad (tabla 1).

**Tabla 1. Estadificación del CACU según la FIGO**

ETAPA CLÍNICA	DESCRIPCIÓN
I	Tumor confinado al cérvix
IA	Tumor invasivo (máx. 5 mm)
IB	Tumor confinado al cérvix con una extensión clínicamente mayor que la etapa IA
II	Tumor que se extiende más allá del cérvix pero no llega la pared pélvica o al tercio inferior de la vagina
IIA	Tumor que invade fondos de saco vaginal sin invasión parametrial
IIB	Tumor con invasión parametrial sin llegar a la pared pélvica
III	El tumor se extiende a la pared pélvica y/o en el tercio inferior de la vagina y/o causa daño renal
IIIA	El tumor se extiende al tercio inferior de la vagina, pero no llega a la pared pélvica
IIIB	El tumor se extiende hasta la pared pélvica y /o causa daño renal
IV	El tumor se extiende fuera de la pelvis o presenta involucro vesical o rectal
IVA	El tumor invade la mucosa de la vejiga o el recto y/o se extiende más allá de la pelvis
IVB	Metástasis a distancia

Las pacientes diagnosticadas en etapas tempranas (IA) presentan una sobrevida promedio del 96% al 99% a 5 años; pacientes en etapa IB del 80 al 90%; en etapa IIB del 65% al 69% y en etapa IIIB del 40%, disminuyendo a 10-15% en etapa IV (Ries, 2006). En México, la sobrevida de las pacientes es menor en etapas tempranas: en etapa I es de 82%; en etapa II de 72.72%, en etapa III de 47% y finalmente, en etapa IV de 21%, un poco superior a los estudios internacionales (Flores-Luna *et al.*, 2000).

## Tratamiento

Según la guía realizada por la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (2013), las pacientes con CACU se dividen en cuatro grupos principales, que deben seguir el tratamiento indicado según sea el caso:

- 1) Para pacientes en etapas tempranas (1A1 a 1A2), el tratamiento se basa sobre todo en histerectomía o histerectomía más disección de nódulos linfáticos pélvicos. En caso de que la paciente desee conservar la fertilidad, se recomienda realizar un cono cervical.
- 2) Las pacientes en etapas localizadas visibles (1B1 a 1B2) deberán tratarse con histerectomía radical. Adicionalmente, el médico tratante deberá considerar si la paciente necesita recibir radioterapia.
- 3) En etapas localmente avanzadas (II y III) el tratamiento se basa principalmente en radioterapia (RT), en un esquema de 25 fracciones (una por día) durante 5 semanas, para poder así reducir el tumor. Posteriormente, se recomienda el incremento del tratamiento con braquiterapia (BQT) (3 ó 4 fracciones, una por semana). Debido a que a partir de etapas IIB disminuye drásticamente el porcentaje de pacientes que responden a terapia convencional, diversos ensayos clínicos han evaluado el beneficio de la quimioterapia y radioterapia concomitantes basada principalmente en cisplatino (Rose, 2007). Por esta razón, la guía de NCCN y las guías en México indican que las pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas deben recibir un esquema terapéutico de RT+CDDP (Montalvo *et al.*, 2011; Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).
- 4) Las pacientes en etapa IV deben recibir RT, BQT y /o quimioterapia (QT), a consideración del médico tratante. El tratamiento de estas pacientes tiene como objetivo la paliación de los síntomas y no se espera una buena respuesta.

En particular, en el Instituto Mexicano del Seguro Social se llevan a cabo esquemas terapéuticos que incluyen: 25 fracciones (una por día) de radiación a

pelvis total, a una dosis de 45 a 50 Gy; 3 ó 4 fracciones de Braquiterapia (2450 a 2600 cGy). En algunos casos, la radioterapia va acompañada de 4 ó 5 fracciones de Cisplatino concomitante (una por semana) en una dosis de 40mg/m<sup>2</sup>. El esquema terapéutico (RT ó RT+CDDP) utilizado dependerá de factores como morbilidad y grado de la lesión.

### **Seguimiento y respuesta a tratamiento**

Según la guía de la NCCN (2013), después de recibir tratamiento, las pacientes deben ser revisadas, sea por palpación directa, citologías o con estudios de imagen, cada 3 ó 6 meses durante los primeros 2 años. De los 3 a 5 años deben tener seguimiento semestral o anual, a criterio del médico tratante.

Según las recomendaciones de la NCCN (2013), los estudios de imagen con PET, resonancia magnética o radiografías convencionales son opcionales, y deberán realizarse en caso de sospecha de recurrencia o en pacientes de alto riesgo.

Si el tumor primario remite o el médico tratante no encuentra evidencia de actividad tumoral durante los cinco años de seguimiento, se considera que la paciente tuvo buena respuesta a tratamiento y se encuentra clínicamente curada (NCCN, 2013).

En algunos casos, el CACU puede permanecer durante y/o después del tratamiento primario, lo que es denominado CACU residual. Para que sea considerado como tal, la actividad tumoral debe detectarse en los primeros 6 meses del seguimiento (NCCN, 2013). Las pacientes también pueden presentar recurrencia, que se define como la presencia del tumor primario o metástasis a distancia al menos 6 meses después del tratamiento (Vargas-Hernández *et al.*, 2014). El 75% de las recurrencias se presentan en los primeros 3 años de seguimiento (Elit *et al.*, 2010). Si la paciente presenta CACU residual o recurrencia (s), se considera que tuvo una mala respuesta a tratamiento (NCCN, 2013).

El 40% al 34% de las pacientes que reciben RT+CDDP concomitante no responden favorablemente a la terapia, lo que se traduce en una sobrevida menor

a 5 años. Se estima que aproximadamente el 40% de las pacientes que reciben RT+CDDP presentan recurrencia en los 5 años después del tratamiento (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, 2008).

La respuesta a tratamiento tiene un impacto directo en la sobrevida global de las pacientes. En México, las pacientes con CACU en etapa I presenten una sobrevida a 5 años de 82%; en etapa II de 72.72%; 47% en etapa III y 21% en etapa IV (Flores-Luna *et al.*, 2000).

Adicionalmente, el tratamiento actual con RT genera morbilidades asociadas como: a) proctitis, que se manifiesta con sangrado rectal y diarrea; b) daño a la vejiga, en la que se manifiestan síntomas como incontinencia urinaria, hematuria, ulceraciones y fístulas; c) estenosis vaginal. El tratamiento con CDDP genera efectos secundarios como: daño renal y daño al sistema nervioso (Tsepov *et al.*, 2011). El alto riesgo de no responder favorablemente al tratamiento, así como las morbilidades asociadas a éste justifican la búsqueda de biomarcadores de respuesta en CACU.

### **Factores que influyen en la respuesta a tratamiento y biomarcadores**

Los factores de pronóstico clínico más importantes son la etapa clínica, el estado de los ganglios linfáticos, las características patológicas del tumor primario, el tamaño del tumor, la profundidad de la invasión al epitelio y/o estroma cervical, el tipo histológico, la invasión al cuerpo uterino y metástasis a distancia.

La respuesta a tratamiento depende de otros factores, como son:

- 1) Factores relacionados con el tumor: grado histológico y etapa clínica (Perez *et al.*, 1992).
- 2) Factores relacionados con el estado de la paciente: edad, peso, morbilidades asociadas (Kapp *et al.*, 1983; Stehman, *et al.*, 1991).
- 3) Factores técnicos del tratamiento: fraccionamiento de la dosis, calendario adecuado, concomitancia (Prise *et al.*, 2009).

- 4) Factores biológicos propios del tumor: expresión aberrante de genes y micro-ambiente tumoral (West *et al.*, 1997; Dewhirst *et al.*, 2008).

### **Biomarcadores de pronóstico y respuesta**

A la fecha, existen pocos estudios que evalúen marcadores de respuesta a tratamiento en CACU, ya sean clínicos o moleculares. Estos biomarcadores podrían utilizarse para seleccionar las pacientes que se beneficiarán del tratamiento con RT+CDDP, o RT sola. A continuación, se revisan dichos biomarcadores y el impacto que tienen en la predicción de la respuesta.

#### **p-AKT**

Se ha mostrado que AKT, en su forma fosforilada y activa, lleva a las células a la inhibición de la apoptosis. Los niveles de expresión de pAKT se relacionan con la tasa de recurrencia en pacientes con CACU tratadas con radioterapia. Las pacientes con pAKT positivo presentaron una mala respuesta a radioterapia, mientras que las pacientes con pAKT negativo presentaron una respuesta más favorable. La media de supervivencia libre de progresión fue de 86 meses para los pacientes con tinción pAKT negativo y de 44 meses para los pacientes con expresión pAKT positivo (Kim *et al.*, 2006). La activación de la vía PI3K/Akt/COX-2 en células HELA genera un declive en la radiosensibilidad de dichas células (Xia *et al.*, 2010).

#### **COX-2**

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) es una enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. COX-2 desempeña un papel fundamental en la regulación de la apoptosis inducida por radiación. Reportaron que la sobre-expresión de COX-2 es un marcador predictor de mala respuesta a tratamiento, menor supervivencia global y libre de enfermedad (Kim *et al.*, 2002;

Ishikawa *et al.*, 2006). Otro reporte muestra que la sobre-expresión de COX-2 es un biomarcador relacionado con una mayor incidencia de metástasis a distancia después de radioterapia (Kim *et al.*, 2003). El papel de COX-2 en la respuesta a tratamiento y sobrevida de las pacientes es controversial. En un estudio más reciente en 84 pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas, se muestra que la baja expresión de COX-2 está asociada a una menor sobrevida global (Doll *et al.*, 2013).

## **NOS**

La sobre-expresión de la sintasa de óxido nítrico (NOS) se asocia con la disminución de la sobrevida y un mayor riesgo de metástasis en pacientes con CACU tratadas con radioterapia (Chen *et al.*, 2005). Un estudio posterior demostró que la NOS juega un papel fundamental en el mantenimiento del tumor, ya que provee irrigación sanguínea a éste (Ng *et al.*, 2007). Esto podría explicar los efectos que tiene la sobre-expresión de NOS en la respuesta a tratamiento y sobrevida de las pacientes con CACU.

## **HIF-1 $\alpha$**

El factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) se ha correlacionado con la respuesta a tratamiento en CACU. La alta expresión de HIF-1 $\alpha$  se asocia con una mala respuesta a radioterapia, un mayor riesgo de metástasis, menor sobrevida global y libre de progresión (Bachtiary *et al.*, 2003; Burri *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2004; Dellas *et al.*, 2008). La respuesta y pronóstico clínico de las pacientes que expresan HIF-1 $\alpha$  puede estar asociada con el tamaño del tumor (Hutchison *et al.*, 2004). Un estudio muestra que HIF-1 $\alpha$  incrementa la proliferación, apoptosis y migración de células de CACU, en parte mediante la regulación de sus genes blanco, como *VEGF*, *HGTD -P*, y *CXCR4* (Tang *et al.*, 2009). Esas evidencias sugieren que HIF1 $\alpha$  puede ser utilizado como un marcador pronóstico en CACU.

## **VEGF**

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un pro-angiogénico en tumores. En un estudio de Zusterzeel *et al.*, (2009) se demostró que las concentraciones de VEGF en suero se correlacionan con tumores más avanzados y agresivos. Los niveles de VEGF en suero también predicen la respuesta a tratamiento: entre más concentración de VEGF, menor es la respuesta a quimio-radioterapia (Du *et al.*, 2014).

## **EGFR**

Múltiples estudios han demostrado que la sobre-expresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) es un predictor independiente de mala respuesta a radioterapia o quimio-radioterapia, está asociado a una menor supervivencia global y libre de enfermedad (Nakano *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2002; Noordhuis *et al.*, 2009; Iida *et al.*, 2011). Se propone a EGFR como un biomarcador de pronóstico clínico y de respuesta a tratamiento (Soonthornthum *et al.*, 2011).

## **SSC-Ag**

El antígeno de carcinoma cervical escamoso (SSC-Ag) se ha descrito como un marcador pronóstico y de respuesta en el suero de pacientes con carcinoma cervical escamoso. Niveles elevados de SSC-Ag se han detectado en el 20-88% de suero de pacientes con carcinoma escamoso cervical (Ohara *et al.*, 2002). Los niveles de SSC-Ag están relacionados con la etapa clínica, el tamaño tumoral y la invasión al estroma (Takeda *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el aumento de SSC-Ag en suero predice la recurrencia en pacientes con CACU. Finalmente, otros estudios muestran que los altos niveles de SSC-Ag tienen valor predictivo para el pronóstico clínico (Gaarenstroom *et al.*, 2000) y de elección de tratamiento adyuvante post-operatorio (Chou *et al.*, 1994).

## **Nuevas opciones de tratamiento: Terapias epigenéticas**

Algunos esquemas terapéuticos tales como terapia epigenéticas se encuentran en estudios de fase clínica (Coronel, 2010; Candelaria 2010) a fin de mejorar la respuesta y la sobrevida global de las pacientes. Se ha reportado que la combinación de hidralazina con ácido valproico sensibiliza a las células de CACU al tratamiento con radiación (Mani *et al.*, 2014). Sin embargo, el beneficio de nuevos esquemas de tratamiento es aún tema de debate (Pearcey 2002; Vale 2008, Dueñas-González, 2010).

Hasta el momento, en CACU no se han establecido biomarcadores predictivos, como ocurre en otros tipos de cáncer, como cáncer de mama (ER, PR, Her-2). Por lo cual sería muy importante determinar el conjunto de alteraciones moleculares asociadas a la respuesta a tratamiento, para lograr identificar biomarcadores predictivos, así como para el diseño de potenciales blancos terapéuticos, a fin de mejorar los índices de respuesta, reflejados en la sobrevida global, sobrevida libre de enfermedad, el control local y la enfermedad libre de metástasis. De esta manera se establecería el tipo de esquema terapéutico que beneficiará a determinada paciente, en función de su perfil molecular.

A la fecha, se han realizado diversos estudios para caracterizar alteraciones genéticas, cromosómicas y de expresión en CACU (Pérez, 2007; Hidalgo, 2005; Vázquez, 2007; Narayan, 2010). Sin embargo, son pocos los estudios enfocados a la descripción de perfiles globales de metilación, lo cual es de gran importancia analizar, ya que a diferencia de las alteraciones genéticas, las alteraciones epigenéticas son potencialmente reversibles.

## Epigenética

La epigenética es la disciplina que estudia los cambios heredables en la expresión génica sin involucrar cambios en la secuencia del DNA (Recillas-Targa y Escamilla, 2004). Las modificaciones epigenéticas se dividen en tres categorías: 1) Metilación del DNA; 2) Modificaciones en las histonas; 3) Regulación por RNAs no codificantes. En el presente trabajo nos enfocamos en la metilación del DNA, por lo que en la siguiente sección se describirán los aspectos más relevantes de este fenómeno en CACU y en células normales.

### Metilación del DNA

La metilación del DNA es la principal modificación en genomas eucariontes, consiste en la adición covalente de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) al carbono 5 de las citosinas en el contexto de dinucleótidos CpG, mediante DNA metil transferasas (DNMT).

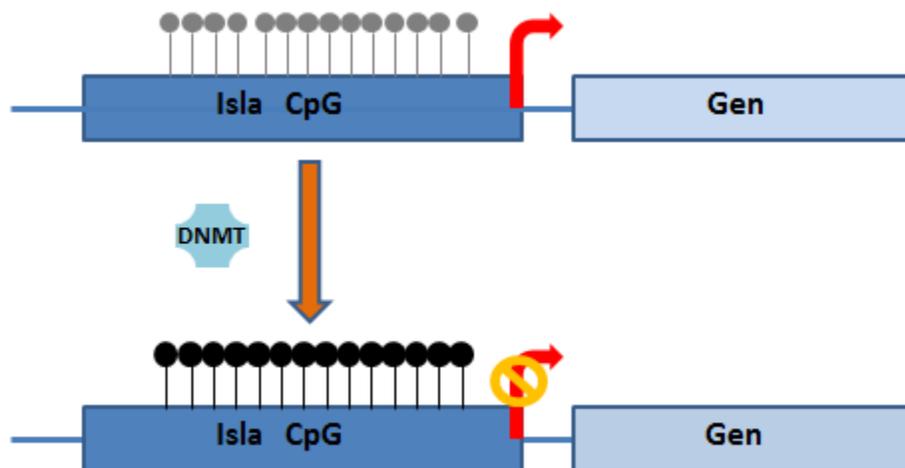
Las islas CpG (ICG) (regiones ricas en CpG asociadas a promotores de genes, de por lo menos 200 pb de longitud) participan en la regulación de la expresión. Se calcula que aproximadamente 60 a 70% de los genes humanos poseen islas CpG en sus regiones regulatorias. En condiciones normales, las islas CpG están protegidas de la metilación, lo cual está asociado con una configuración abierta de la cromatina, caracterizada por la presencia de histonas acetiladas (Weber *et al.*, 2007).

Trabajos pioneros de Antequera (1990) demostraron que la inactivación de genes en líneas celulares de cáncer se asocia, generalmente, con metilación de islas CpG (figura 3).

La hipermetilación es un fenómeno clásico de inactivación de genes supresores de tumor asociados al desarrollo de cáncer, tales como *Retinoblastoma (Rb)*, *von Hippel Lindau (VHL)*, *Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2 (CDKN2)*, *Breast Cancer Associated (BRCA)*, *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* y *Glutathión transferasa pi 1 (GSTP1)* (Esteller *et al.*, 2002). En algunos tipos de cáncer, como cáncer de

mama y cáncer de colon y recto, se ha sugerido que existe un “fenotipo metilador de islas CpG”, en el que múltiples genes en las células malignas se encuentran frecuentemente metilados, asociado a características clínicas particulares, lo cual podrían servir como base para clasificar distintos subtipos tumorales (Issa, 2004). Se ha observado que algunos de los genes que forman parte de este fenotipo, constituyen supresores de tumor clásicos, como *Rb*, *p16*, *MLH1*, *APC* y *HIC1*, entre otros (Mulero-Navarro *et al.*, 2008).

La hipermetilación de regiones promotoras, se ha propuesto como mecanismo de progresión neoplásica y se ha observado en la iniciación y progresión (Jones, 2007); por lo que se sugieren como potenciales biomarcadores para el diagnóstico temprano, progresión y respuesta a terapia (Sevoba, *et al.*, 2011; Mahapatra *et al.*, 2012; Liloglou, 2012).



**Figura 3. Mecanismos de activación/inactivación transcripcional mediada por la metilación de islas CpG.** La hipometilación de islas CpG favorece la transcripción del gen blanco, mientras que la hipermetilación se asocia con el silenciamiento del gen. La metilación del DNA es mediada por las enzimas DNA metil-transferasas (DNMTs)

Por ejemplo, la determinación de la metilación del promotor del gen *MGMT* predice la respuesta al tratamiento de temozolomida en glioblastomas (Hegi, 2005).

La metilación de islas CpG en promotores, como ya se ha descrito, es un fenómeno ampliamente caracterizado en células normales y cáncer. Sin embargo, en estudios más recientes se ha identificado la existencia de regiones de metilación diferencial (DMRs), cuyo perfil de metilación distingue entre diversos tejidos humanos (cerebro, hígado, y bazo), y entre tejido normal de colon y cáncer de colon. Las DMRs se encuentran enriquecidas (en el 76% de las regiones regulatorias analizadas) en las “costas CpG”; que son secuencias localizadas en los bordes (2 kb de distancia) de las islas CpG, (Irizarry *et al.*, 2009). En este mismo estudio demostraron que la metilación en las costas CpG, además, está relacionada con la expresión de los genes asociados, dado que la hipermetilación de las costas se correlaciona con un silenciamiento del gen y viceversa.

### **Alteraciones de la metilación en CACU y posibles marcadores**

Actualmente, existen un gran número de reportes sobre perfiles de metilación de DNA en CACU, líneas celulares y lesiones precursoras (tabla 3). Sin embargo, estos estudios se ven limitados por el número de genes que son analizados en cada estudio, los cuáles fueron seleccionados en su mayoría, por estar reportados previamente en otros tipos de cáncer; además de la heterogeneidad de resultados debido al tipo de muestras analizadas (frescas, en parafina, biopsias, citologías) así como a la sensibilidad y especificidad de los diversos métodos utilizados para el análisis (ver tabla 2).

Una revisión sistemática a partir de 3546 artículos, mostró que sólo 51 presentaban datos sobre las frecuencias de metilación en las diversas etapas del desarrollo de CACU. En lo cuales se identificaron 68 genes, donde destacan 15 por ser los más estudiados: *DAPK1*, *RASSF1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *MGMT*, *RARB*, *APC*, *FHIT*, *MLH1*, *TIMP3*, *GSTP1*, *CADM1*, *CDH13*, *HIC1* y *TERT*. Sin embargo,

en la mayoría de los genes analizados los datos obtenidos en los distintos estudios son muy heterogéneos ya que se han reportado diferencias en la frecuencia de metilación desde 10 a 90% y sólo en tres genes se encontró consistencia en cuanto a las frecuencias de metilación: *DAPK1*, *CADM1* y *RARB*. (Wentzensen, 2009)

**Tabla 2. Metodologías para el análisis de metilación del DNA**

METODO	FUNDAMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR metilación-específica (MSP)	Conversión por medio de bisulfito de sodio, el cual convierte las citosinas no metiladas en uracilo, mientras que las citosinas metiladas son protegidas de la conversión. El DNA convertido se amplifica por PCR punto final, usando primers que reconocen las citosinas metiladas y las no metiladas.	Ensayos de estandarización sencilla Alta sensibilidad Se necesita poco DNA	Permite falsos positivos. Cualitativo
MSP cuantitativo (Methylight)	El fundamento es similar a MSP, con la variante de que utiliza sondas y la detección es por PCR tiempo real.	Cuantitativo Alto rendimiento Se necesita poco DNA	Diseño complicado de primers y blancos No se puede analizar metilación parcial
Bisulfito y secuenciación	Conversión por medio de bisulfito de sodio. Se amplifica el DNA convertido con PCR y se secuencia.	Estándar de oro. Análisis de mayor número de CpG que MSP. Cuantitativo Determinación de metilación de cada CpG individual	Conversión incompleta puede arrojar falsos positivos Degradación de DNA por tratamiento con bisulfito
Restricción enzimática sensible a sitios metilados	Digestión del DNA con enzimas sensibles y dependientes de metilación. Detección por PCR punto final o tiempo real.	Método sencillo y de poca estandarización. Poca cantidad de DNA	Digestión incompleta genera falsos positivos Limitado a librerías de enzimas de restricción
Inmunoprecipitación de sitios metilados (MeDIP) acoplada a secuenciación o microarreglos	Inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-metil-citosina, para después hibridar el DNA en microarreglos o secuenciarlos.	Análisis de metilación de un gran número de CpGs Buena reproducibilidad	Poca sensibilidad en regiones bajas en CpG Gran cantidad de DNA y anticuerpo Alto costo

Uno de los estudios que más genes analiza es el reportado Sova y cols. (2006), donde determinan el perfil de metilación de 39 promotores. El abordaje de su estudio, contempló inicialmente el análisis de expresión de líneas celulares y la selección de genes reactivados en la expresión por agentes desmetilantes, para posteriormente analizar la metilación específica de los promotores.

Gracias a esta estrategia fue posible detectar la metilación aberrante de seis genes que previamente no habían sido descritos en CACU: *SPARC*, *TFPI2*, *RRAD*, *SFRP1*, *MT1G* y *NMES1*.

Sin embargo se ha calculado que aproximadamente el 57% de los *loci* metilados en líneas celulares no se encuentran metilados en los correspondientes tumores sólidos; por lo cual no se puede probar la relevancia de genes específicamente metilados detectados en líneas celulares, hasta identificarlos en los correspondientes tumores primarios (Smiraglia, 2001).

Gracias al desarrollo de plataformas de análisis masivo como los microarreglos y la secuenciación masiva, es posible identificar las alteraciones globales en la metilación del DNA en tumores. Al respecto, se han realizado estudios en cáncer de mama (Korshunova, 2007) de pulmón (Rauch, 2007), de colon (Irizarri, 2009) y próstata, (Kron, 2009). Con esta estrategia se ha logrado identificar nuevos marcadores epigenéticos de importancia en la progresión.

Sin embargo en CACU, son pocos los estudios sobre perfiles globales de metilación. Uno de ellos se basa en el análisis *in silico* a partir de resultados de microarreglos de expresión donde identificaron y validaron tres genes *SST*, *HTRA3* y *NPTXI*, que se encuentran metilados en CACU en contraste con epitelio cervical normal (Ongenaert, 2008).

En otro estudio, mediante búsqueda de marcas de restricción genómica por sus siglas en inglés RLGS (restriction landmark genomic scanning), lograron identificar por primera vez la metilación de los genes *NOL4* y *LHFPL4*, sugiriendo el análisis de metilación de estos genes para la detección temprana de CACU (Wang, 2008).

Lai y cols. (2008) utilizaron un microarreglo de 8640 islas CpG (Universidad de Toronto) en el cual hibridaron un “pool” de 30 tumores cervicales y un “pool” de 10 muestras normales de cepillados cervicales. Con este procedimiento lograron identificar seis genes hipermetilados en adenocarcinomas: *SOX1*, *PAX1*, *LMX1A*, *NKX6-1*, *WT* y *ONECUT*.

Posteriormente, en un estudio con 676 pacientes, se reportó que SOX1 y/ o PAX1 metilado son marcadores de detección de lesiones precursoras de alto grado (Lai *et al.*, 2014).

**Tabla 3. Genes frecuentemente metilados en CACU**

GEN	FUNCIÓN	REFERENCIA
APC	Vía de Wnt	Yang <i>et al.</i> , 2006
BRCA1	Vía de FA-BRCA	Narayan <i>et al.</i> , 2004
CALCA	Regulación de Ca	Wisman <i>et al.</i> , 2006;
CADM1	Adhesión célula-célula	Yang <i>et al.</i> , 2006; De Strooper <i>et al.</i> , 2014
CDH13	Adhesión célula-célula	Widschwendter <i>et al.</i> , 2004
CDKN2A	Ciclo celular	Furtado <i>et al.</i> , 2010
CCNA1	Ciclo celular	Zuo <i>et al.</i> , 2014
DAPK1	Apoptosis	
DOC2B	Transporte vesicular mediado por Ca	Kabekkodu <i>et al.</i> , 2014
ER (ESR1)	Factor de transcripción regulado por hormonas esteroides	Wisman <i>et al.</i> , 2006; Kirn <i>et al.</i> , 2014
FANCF	Vía de FA-BRCA	Narayan <i>et al.</i> , 2004
FHIT	Metabolismo de purinas	Virmani <i>et al.</i> , 2001; Bai <i>et al.</i> , 2014
HIC1	Represor transcripcional	Dong <i>et al.</i> , 2001
HPCAL4	Regulación de canales de Ca	Sova <i>et al.</i> , 2006
HS3ST2	Síntesis de heparan sulfato	Shivapurkar <i>et al.</i> , 2007
IFN- $\gamma$	Señalización de sistema inmune	Ma <i>et al.</i> , 2014
MGMT	Reparación del DNA	Virmani <i>et al.</i> , 2001;
MLH1	Reparación del DNA	Widschwendter <i>et al.</i> , 2004
p73	Apoptosis	Henken <i>et al.</i> , 2007
PTCH1	Señalización mediada por Hedgehog	Chakraborty <i>et al.</i> , 2014
PTEN	Vía de Wnt	Cheung <i>et al.</i> , 2004
POU2F3	Diferenciación	Zhang <i>et al.</i> , 2006
RARB	Diferenciación	Zhang <i>et al.</i> , 2007
RASSF1A	Vía de Ras (regulador negativo)	Lai <i>et al.</i> , 2007
RASSF2A	Vía de Ras (regulador negativo)	Zhang <i>et al.</i> 2014
h-TERT	Apoptosis	Iliopoulos <i>et al.</i> , 2007
TIMP2/ TIMP3	Inhibición de Metalopeptidasas	Ivanova <i>et al.</i> , 2004; Jeong <i>et al.</i> , 2006

En otro estudio independiente, se validó a PAX1 metilado como un biomarcador de diagnóstico de lesiones precursoras de alto grado o cáncer, y se mostró que la presencia de dicho marcador, en combinación con la prueba de Papanicolau, alcanzó un 89% de sensibilidad y un 83% de especificidad (Kan *et al.*, 2014).

Tian *et al.*, (2015) reportaron que la identidad exacta de los CpGs metilados es importante para definir pacientes con lesiones precursoras de bajo y alto grado. En este mismo estudio, encontraron un modelo de clasificación para identificar pacientes con lesiones de alto grado, que involucra cinco sitios CpG de SOX1, PAX1, NKX6-1 y LMX1A y en conjunto logra 81.2 % de especificidad, del 80.4 % de sensibilidad y 80.8 % de precisión (Tian *et al.*, 2015). Un reporte muestra que LMX1A funciona como un supresor de invasión y metástasis en CACU (Liu *et al.*, 2009).

Un estudio de Lee (2010) identifica mediante microarreglos de promotores, 21 genes diferencialmente metilados en adenocarcinomas comparados con carcinomas epidermoides, entre los que destacan NOGOR y PAK6.

Otro estudio global reportó que la metilación del gen ZNF568 puede utilizarse como biomarcador de tamizaje entre lesiones precursoras de bajo grado y lesiones de alto grado (NIC3) o CACU (Huang *et al.*, 2012). En un estudio en el que se utilizaron microarreglos Not1 se describió que treinta genes supresores de tumores o candidatos, como VHL, RBSP3/CTDSPL, ITGA9, LRRC3B, ALDH1L1, EPHB1 y genes no asociados anteriormente a cáncer, como ABHD5, C3orf77, PRL32, LOC285375, FGD5 presentan hipermetilación de sus promotores en el 44% de los tumores analizados (Senchenko *et al.*, 2013).

Un reporte sugiere que la vía de señalización  $\beta$ -catenina se encuentra desregulada en CACU a nivel epigenético, debido a que los genes AJAP1, EDN3, EPO, MAGI2 y SOX17 están hipermetilados (Chen *et al.*, 2014).

En otro estudio, se reportó que el estado de metilación diferencial de aproximadamente 27,000 islas CpG a lo largo del genoma obtenido a partir de muestras cervicales sin alteraciones neoplásicas, predice el riesgo de una futura transformación maligna. Entre los genes hipermetilados asociados a riesgo, se encuentran HOXC10 y HOXC11 (Teschendorff, *et al.*, 2012).

Los estudios globales de metilación en CACU describen las alteraciones que presentan algunos genes. Estos datos son antecedentes de trabajos posteriores, que se han enfocado en el uso de estos biomarcadores en el tamizaje y diagnóstico de pacientes con lesiones precursoras y CACU. Tal es el caso de los estudios de Kan *et al.* (2014) y Tian *et al.* (2015) mencionados anteriormente. En otro estudio mostraron que la metilación de *EPB41L3* es el mejor clasificador de lesiones de alto grado (a partir de un conjunto de seis genes) en muestras VPH positivas y negativas (Vasiljević *et al.*, 2014). Finalmente, se caracterizó la metilación de los genes *MAL* y *miR124-2* como marcadores de tamizaje en lesiones precursoras de alto grado de auto-toma (Verhoef *et al.*, 2014).

### **Marcadores de metilación y respuesta a tratamiento en CACU**

A la fecha, existen pocos estudios que asocien el estado de metilación del DNA con la respuesta a tratamiento o sobrevida de las pacientes con CACU. Un estudio demostró que la hipermetilación de los promotores de genes *DAPK* y *FAS* está asociado a la mala respuesta a tratamiento en pacientes con CACU (Chaopatchayakul *et al.*, 2010).

Otro estudio evaluó la relación entre el estado de metilación de 18 genes de reparación y la morbilidad de la radioterapia con cisplatino concomitante. Se demostró que el gen *XRCC2* se encuentra hipermetilado en pacientes que presentan morbilidad al tratamiento (Pauliková *et al.*, 2013).

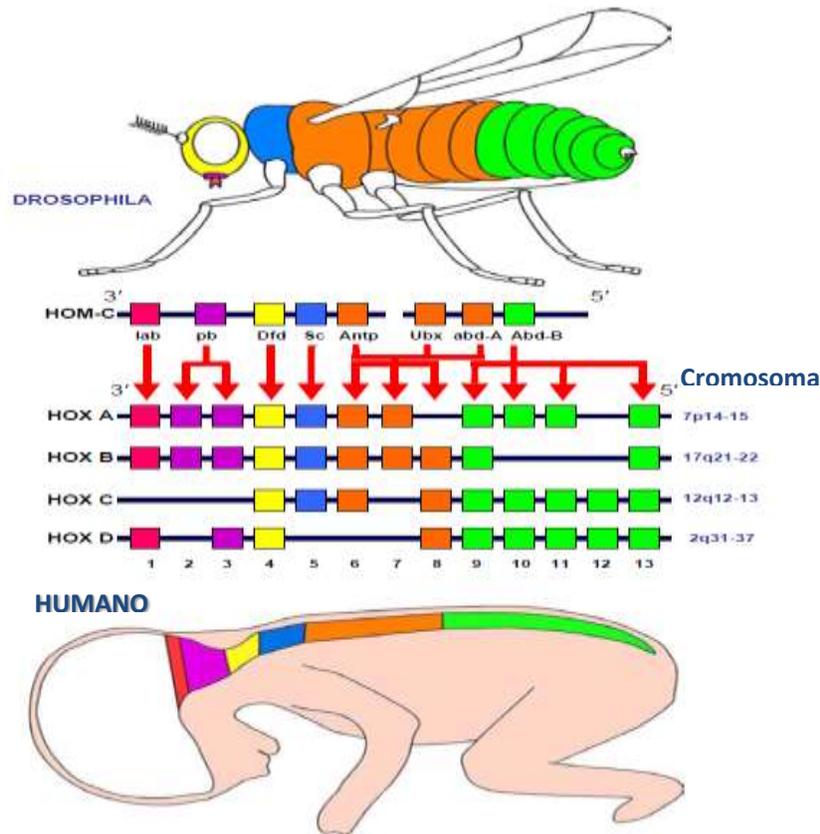
Finalmente, un estudio sugiere que la regulación a la baja por metilación del gen *GSX* está asociada con el riesgo de metástasis linfática y pobre pronóstico clínico de pacientes con CACU (Zhang *et al.*, 2014).

### **Los Genes *HOX* como marcadores epigenéticos**

#### **Familia de genes *HOX***

Los genes *HOX* son parte de la súper-familia de factores de transcripción homeobox, que comparten un dominio de unión al DNA (homeodominio) en el

exón 2. En humanos, se han identificado 39 genes *HOX*, agrupados en 4 clusters. Los *HOX* participan en la regulación del eje antero-posterior y en el desarrollo de órganos y extremidades durante la embriogénesis (Mallo, *et al.*, 2010).



**Figura 4. La familia de genes *HOX* y su agrupación genómica en clusters.**

Los genes *HOX* humanos tienen su origen en el cluster *Hox* de *Drosophila melanogaster*. Así, los genes parálogos 1 corresponden a los genes Labial (*lab*) de la mosca; los parálogos 3 y 4 corresponden al grupo proboscipedia (*pb*); los genes 4 a Deformed (*Dfd*); los parálogos 5 a Scute (*Sc*); los genes 6,7 y 8 a Antennapedia (*Antp*) y Ultrabithórax (*Ubx*) Finalmente, los parálogos 9 al 13 corresponden a los grupos Abdominal A (*Abd A*) y Abdominal B (*Abd B*). Modificado de Lappin *et al.*, 2006.

Los cuatro clusters humanos (*HOXA-D*) se localizan en diferentes regiones genómicas: 7p15, 17q21.2, 12q13 y 2q31, respectivamente. Como se muestra en la figura 4, cada cluster incluye 13 grupos parálogos de nueve a trece genes, asignados de acuerdo a la homología de la secuencia y a su posición dentro del cluster. Existe una gran homología entre los genes *HOX* de la mosca y de humano, por lo que los parálogos 1-8 se asocian directamente con los genes *Antp*, mientras que los grupos 9-13 se relacionan con los genes *Abd-B* (Lappin et al., 2006) (ver figura 4).

Cada uno de los genes *HOX* especifica regiones anatómicas durante el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* y en humano. Los genes *HOX* de la mosca tienen una alta homología con los *HOX* humanos.

Durante el desarrollo embrionario, las células requieren información posicional para asegurar que la diferenciación en un tejido sea adecuada. Para lograr este objetivo, el orden de expresión de los genes *HOX* se encuentra estrictamente regulado. Los genes localizados en el extremo 3' del cluster se expresan primero, y dirigen la diferenciación y morfogénesis de las regiones anteriores del cuerpo.

En contraste, los genes *HOX* del extremo 5' se expresan más tardíamente, y dirigen la diferenciación de las zonas posteriores del embrión. A estos fenómenos se les conoce como "principio de colinearidad temporal y espacial" (Kmita y Dobuole, 2003).

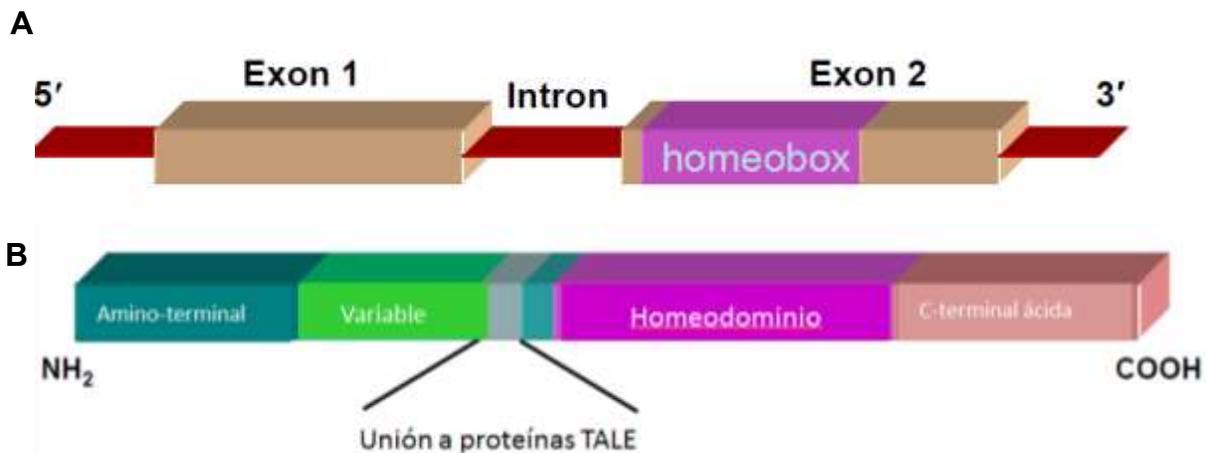
### **Estructura y función general de los genes *HOX***

Los genes *HOX* comparten una estructura común: poseen dos exones y un intrón central que mide de 200 pb a varias Kb (figura 5A). Los exones codifican para una proteína que se divide en las siguientes regiones (Lappin et al., 2006) (figura 5B):

- 1) Un dominio carboxilo terminal, compuesto de aminoácidos ácidos.
- 2) Un homeodominio que es el dominio de unión a DNA. Dicho dominio altamente conservado está formado por 3 regiones: La hélice 3, que

contacta al surco mayor del DNA; y las hélices 1 y 2 que contactan al DNA en el surco menor.

- 3) Un dominio variable, dentro del cual se encuentra el motivo de unión a TALE. Este motivo reconoce a los cofactores clásicos de las proteínas *HOX*: PBX y MEIS.
- 4) Un dominio amino-terminal (“brazo” amino-terminal), que genera contactos adicionales con el DNA.



**Figura 5. Estructura general de los genes y las proteínas *HOX*.** Se muestran las regiones génicas y proteínicas de la familia *HOX*. A) Los genes *HOX* están formados por dos exones y un intrón intermedio. El dominio homeobox se encuentra en el segundo exón. B) Las proteínas *HOX* contienen un dominio amino-terminal, una región variable, un motivo de unión a proteínas TALE, un homeodominio y un dominio C-terminal.

Modificado de Lappin, *et al.*, 2006

Las proteínas *HOX* reconocen una secuencia consenso en los promotores de sus genes blanco, que es TAAT (Mallo, 2008). Los cofactores PBX y MEIS, le confieren especificidad de unión a las secuencias TAAT. Se ha demostrado que PBX se une a proteínas *HOX* anteriores (1-7); mientras que MEIS se une a *HOX* posteriores (8-13) (Moens y Selleri, 2006).

Los genes *HOX* son reguladores maestros de la diferenciación, y controlan además otros procesos celulares en el adulto como proliferación y apoptosis, entre

otros. La regulación de estos procesos está relacionada con los genes blanco que modulan a nivel transcripcional, por lo que los genes *HOX* no son efectores, sino que actúan río arriba de las vías de señalización.

Estudios funcionales han mostrado que los genes *HOX* pueden tener funciones oncogénicas o supresoras de tumor, dependiendo del contexto de su expresión (Shah y Sukmar, 2010). Los genes *HOX* que se expresan durante el desarrollo embrionario y después son silenciados en el adulto pueden reactivarse en tumores, y ser oncogénicos. Los genes *HOX* que se encuentran activos en tejidos adultos, pero silenciados en tumores, poseen propiedades supresoras de tumor (Daria y Naora, 2013). En otra sección, se describen algunas alteraciones en la expresión y metilación de los genes *HOX* encontradas en tumores.

### **Regulación transcripcional de los genes *HOX***

La regulación transcripcional de los genes *HOX* se presenta bajo diferentes mecanismos: 1) Remodelación de la cromatina por dominios nucleares; 2) Modificaciones locales de marcas de histonas; 3) Metilación del DNA; 4) RNAs no codificantes (Tschopp *et al.*, 2012).

A continuación, se describirán cada uno de estos mecanismos.

#### **1) Remodelación de la cromatina por dominios nucleares**

Como se mencionó anteriormente, los genes *HOX* están organizados en clusters. Este arreglo colineal está sujeto a una activación transcripcional ordenada durante el desarrollo embrionario. Para caracterizar este fenómeno, se realizaron estudios empleando una técnica que permite estimar la estructura de la cromatina, llamada captura de conformación cromosómica (3C) y sus variantes. Estos reportes muestran que la organización tridimensional de los clusters *HOX* cambia de manera dinámica durante la diferenciación celular (Fraser *et al.*, 2009; Ferraiuolo *et al.*; 2010; Wang *et al.*, 2011).

En células indiferenciadas, la cromatina de los clusters *HOX* se encuentra compactada, se localiza en dominios nucleares inactivos, mientras que las histonas presentan marcas represivas. En esta configuración cromosómica, los elementos regulatorios en *cis*, (que se describen más adelante) se encuentran silenciados (Grau *et al.*, 2011; Noordermeer *et al.*, 2011). Conforme avanza la diferenciación, los clusters *HOX* se van activando gradualmente, lo que se asocia con cambios en la configuración de la cromatina y la entrada de ésta en dominios nucleares activos. Este re-ordenamiento de la cromatina expone los elementos regulatorios en *cis*, posibilitando el acceso de factores de transcripción y de la maquinaria basal (Noordermeer *et al.*, 2011).

Este modelo explica a nivel molecular la colinearidad temporal y espacial característica de los genes *HOX*. Algunos reportes demuestran que en algunos casos, si los genes *HOXD* de vertebrados se aíslan y después son insertados en otra posición dentro del cluster, pierden su información regulatoria, la colinearidad temporal, y la distribución de los transcritos en el eje antero-posterior (van der Hoeven *et al.*, 1996; Kmita *et al.*, 2002). Estas alteraciones posicionales también provocan cambios morfológicos en el embrión (Tarchini *et al.*, 2006; Montavon *et al.*, 2008).

Por lo tanto, la expresión de los genes *HOX* es regulada por medio de mecanismos globales y de largo alcance durante la diferenciación celular y/o desarrollo embrionario. En la siguiente sección se describirán otros mecanismos involucrados en la regulación fina de dichos genes.

## **2) Modificaciones locales de marcas de histonas**

Algunos estudios en *Oikopleura dioica* muestran que si se aíslan genes *HOXD* de su cluster para posteriormente insertarlos en posiciones al azar a lo largo del genoma, dichos genes recapitulan sus patrones de expresión específicos. Los autores concluyen que las unidades transcripcionales aisladas conservan la información regulatoria local (Seo *et al.*, 2004; Tschopp *et al.*, 2012). Este

fenómeno puede explicarse en el contexto de la regulación mediada por Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG).

La regulación génica de la familia *HOX* está mediada por dos complejos proteicos: PcG y TrxG. Dichos complejos modifican las marcas de histonas y por lo tanto, la estructura de la cromatina local. PcG inactiva la expresión de los genes *HOX* utilizando dos complejos represivos: PRC1 y PRC2. PRC2 induce la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), que es una marca asociada con silenciamiento (Cao *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002). El complejo PRC1 es reclutado a H3K27me3 para inducir la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (Min *et al.*, 2003), lo cual es mediado por la ubiquitina ligasa E3 Ring1B (que forma parte de PRC1) (de Napoles *et al.*, 2004).

En contraste, el complejo TrxG induce la tri-metilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3), una marca asociada con activación transcripcional (Ruthenburg *et al.*, 2007).

Por lo tanto, H3K27me3 y H3K4me3 se encuentran principalmente asociados a promotores inactivos y activos, respectivamente, y no constituyen marcas estables, sino altamente dinámicas. En células en proceso de diferenciación, algunos genes *HOX* se encuentran silenciados. En estos *loci* inactivos, están presentes ambas marcas de histonas (H3K27me3 y H3K4me3), conformando un dominio bivalente (Bernstein, *et al.* 2006). En un estudio *in vivo*, se observó que durante la extensión del eje principal del embrión de ratón, H3K27me3 se pierde gradualmente en el cluster *HOX D*. De manera concomitante, se gana la marca H3K4me3 y se incrementa la actividad transcripcional en dicho cluster. Por lo tanto, se sugiere que los dominios bivalentes conforman un estado inactivo, aunque preparado para un inicio rápido de la transcripción (Tschopp *et al.*, 2012).

En conclusión, PcG y TrxG combinan sus actividades para regular de manera fina la expresión de los genes *HOX* durante la diferenciación celular y el desarrollo embrionario.

### 3) Metilación de DNA

Las modificaciones en las marcas de histonas y consecuente apertura y cierre de la cromatina generan cambios en el estado de metilación de las islas CpG asociadas a los promotores de los genes HOX (Hanson *et al.*, 1999; Fanti *et al.*, 2008).

Se ha reportado que algunos genes hipermetilados funcionan como sitios de unión de PRC y presentan la marca H3K27me3 en desarrollo embrionario temprano (Ohm *et al.*, 2007; Schlesinger *et al.*, 2007; Widschwendter *et al.*, 2007). En otro estudio, se mostró que Lsh se asocia con algunos genes HOX y regula la unión de DNMT3b, la metilación de DNA y el silenciamiento de dichos genes durante el desarrollo embrionario. Adicionalmente, Lsh se asocia con subunidades de PRC1 e influye en las modificaciones de histonas mediadas por dicho complejo (Xi *et al.*, 2007).

En un estudio, se demostró que el *locus HOXC8* se hipermetila en células Mll<sup>-/-</sup>, lo cual sugiere un papel de Mll en la metilación de genes *HOX* (Milne *et al.*, 2002). En otro estudio, se mostró que en ausencia del dominio SET de Mll, se reducen los niveles de la marca H3H4me1 y que esto, a su vez, se asocia con la hipermetilación de *HOXD4* (exón 6) (Terranova *et al.*, 2006). Posteriormente, se demostró que la presencia de la proteína Mll en el *locus HOXA9*, específicamente en algunos dinucleótidos CpG de una isla cercana al primer exón alternativo, protege a éstos de la metilación. Esta protección se asocia al mantenimiento de la expresión de HOXA9. Si Mll está ausente, la región mencionada se metila y el gen se silencia. En este reporte, los autores sugieren que Mll impide el acceso a las DNMTs para así evitar la metilación *de novo*, o bien que podría existir un mecanismo más complejo que involucra la interacción otras proteínas de unión a DNA, como Sp1, remodeladores de la cromatina, HATs, HDACs para posicionarse en el *locus* y modificar las marcas epigenéticas (Erfurth *et al.*, 2008).

En conjunto, estas evidencias sugieren un modelo de retroalimentación entre el silenciamiento mediado por PRC, la activación mediada por TRX, el estado de metilación de promotores de los genes *HOX* y la expresión de dichos genes.

#### **4) Regulación mediada por ncRNAs**

Estudios recientes han demostrado que la transcripción de los genes *HOX* es regulada por RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y por micro RNAs (miRNAs). A continuación, se describirán brevemente los mecanismos de regulación mediada por ncRNAs.

Se ha mostrado que los lncRNAs interactúan con remodeladores de la cromatina y con factores de transcripción para modular la expresión de los genes *HOX* durante el desarrollo embrionario. En este contexto, se ha reportado que algunos lncRNAs interactúan con subunidades de PcG y TrxG, para posteriormente dirigirlos a los genes *HOX* y regular su expresión. En la literatura, se han reportado dos ejemplos de lncRNAs que realizan esta función: *HOTTIP* y *HOTAIR*.

*HOTTIP* es transcrito a partir de la región 5' del gen *HOXA13*, en dirección antisentido. *HOTTIP* interactúa con *WDR5*, una subunidad de TrxG, que a su vez recluta a otras subunidades del complejo para finalmente inducir la marca activa H3K4m3 en el cluster *HOXA*.

Por otro lado, *HOTAIR* es transcrito en dirección antisentido en la región intermedia entre *HOXC11* y *HOXC12*. Interactúa con *LSD1* y *PRC2*, funcionando como adaptador para ensamblar dicho complejo sobre el cluster *HOXD*. *HOTAIR* modula la regulación dinámica entre las marcas activas (H3K4me3) y las inactivas (H3K27me3) durante el desarrollo embrionario, en diversos tejidos (Tschopp *et al.*, 2012).

#### **Alteraciones en la metilación y expresión de los genes *HOX* en cáncer**

Numerosos estudios han reportado alteraciones genéticas y epigenéticas de los genes *HOX* en distintos tipos de cáncer.

En células de cáncer de mama, se ha caracterizado la hipermetilación *de novo* del promotor del gen *HOXD4*, en un proceso mediado por miRNA-10a (Tan *et al.*, 2009). Otros estudios muestran que algunos dinucleótidos CpG en el *locus* *HOXD4* se metilan en cáncer gástrico y hepático (Kim *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012), pero ningún estudio a la fecha ha asociado estas alteraciones con aspectos clínicos de estas enfermedades.

Se ha reportado la hipermetilación del promotor *HOXB13* en cáncer de mama (Novak *et al.*, 2006; Rodríguez, *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014), en carcinoma renal (Okuda *et al.*, 2006), próstata (Liu *et al.*, 2012) y colorectal (Ghoshal *et al.*, 2010). Se ha propuesto que *HOXB13* funciona como supresor de tumores en melanoma, carcinomas renales y colorectales (Muthusamy *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Ghoshal *et al.*, 2010). En un estudio, la metilación de sitios CpG en el promotor de *HOXB13* está asociada con los subtipos luminales y con una menor supervivencia de las pacientes (Conway *et al.*, 2014). Pilato *et al.* (2013) mostraron que la hipermetilación de *HOXB13* está relacionada con un índice de proliferación mayor, y con una alta expresión de receptores hormonales de estrógenos y progesterona. Algunos sitios CpG asociados a *HOXC4* se encuentran hipermetilados en pacientes con glioblastoma, y que se asocia a una supervivencia menor a 36 meses (Shinawi *et al.*, 2013).

Sitios CpG en el cuerpo y promotor del gen *HOXC13* se encuentran hipermetilados en células de carcinoma oral, comparados con queratinocitos sanos (Marcinkiewicz y Gudas, 2014) por lo que los autores sugieren un posible papel de *HOXC13* en la transformación de los queratinocitos.

Se reportó que el promotor del gen *HOXD3* se encuentra hipermetilado en cáncer de próstata, como parte de una firma molecular que predice recurrencia bioquímica y progresión en estos tumores (Kron *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Litovkin *et al.*, 2014). Adicionalmente, la metilación de *HOXD3* aumenta conforme a la edad, etapa clínica y el grado en dichos cánceres (Kron *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

Se mostró que un grupo de pacientes con melanoma con progresión a nódulos linfáticos, presentan hipermetilación de algunos sitios CpG del promotor *HOXD9*,

lo cual se asocia con una menor sobrevida global y libre de enfermedad (Marzese *et al.*, 2014).

La hipermetilación del promotor de *HOXD10* se ha reportado en linfoma folicular, cáncer oral y gástrico (Bennett *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2014). *HOXD10* se ha propuesto como supresor de tumor en cáncer gástrico, ya que se encuentra frecuentemente silenciado por metilación en su promotor (Wang *et al.*, 2012).

Los ejemplos anteriores muestran que la desregulación de los genes HOX está asociada con la carcinogénesis y la progresión, y que podrían utilizarse como marcadores de pronóstico en cáncer de mama o gástrico. Sin embargo, existen pocos estudios que caractericen alteraciones de los genes HOX en CACU. A la fecha, solo se han reportado la sobre-expresión de los transcritos: *HOXC5*, *HOXC8*, *HOXC9*, *HOXB13*, *HOXC10*, *HOXC11*, *HOXC12*, *HOXC13*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD13* (López *et al.*, 2006; Alami *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2003; Zhai *et al.*, 2007; Cantile *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2003). En otro reporte, se muestra que hay un incremento en la expresión de las proteínas HOXB4 y HOXB13 en CACU (González-Herrera *et al.*, 2015). Por lo tanto, a la fecha, no existen reportes del estado de metilación de los genes *HOX* en CACU, ni su asociación con la respuesta a tratamiento en dichas pacientes.

## **ANTECEDENTES**

Recientemente, se identificó la hipermetilación de *HOXC10* en epitelio cérvico vaginal como factor asociado al desarrollo de lesiones precursoras (Teschendorff *et al.*, 2012). En contraste, la sobreexpresión de *HOXC10* en CACU se asoció con la invasión en ensayos in vitro e in vivo (Zhai, *et al.*, 2007); pero se desconoce si existe una correlación entre la expresión y la metilación en este caso.

Recientemente, se publicó un estudio que analiza los patrones de metilación del genoma en respuesta a la infección por VPH16 y VPH18 en queratinocitos humanos. Se encontró que la infección por VPH de al menos uno de los tipos virales, impone un perfil de hipermetilación en las bandas cromosómicas donde se

encuentran los clústers *HOX A* (7p15.2) y *HOX D* (2q31.1). Al mismo tiempo, el virus podría imponer un perfil de hipometilación en el clúster *HOX C* (12q13) (Leonard *et al.*, 2012).

A la fecha no se ha analizado el papel de la metilación de los genes *HOX* y su relación con la progresión del CACU, lo cual sería importante debido a que en etapas localmente avanzadas, sólo 66% de las pacientes tienen una sobrevida a 5 años y se desconoce los factores involucrados en este fenómeno (Ries *et al.*, 2006).

Por lo tanto, se sugiere que uno de los factores involucrados en la respuesta a terapia o quimioresistencia es la hipermetilación de genes específicos, en este sentido la familia de factores de transcripción *HOX* representan un modelo interesante de estudiar debido a su función como reguladores maestros, así como a la poca información que existe en sobre las alteraciones epigenéticas en CACU como la metilación del DNA, la cual es potencialmente reversible.

## **JUSTIFICACIÓN**

El CACU es aún, un problema de salud pública en nuestro país por ser la segunda causa de mortalidad por neoplasias en mujeres. La infección de VPH es una causa necesaria, más no suficiente, para el desarrollo de esta neoplasia. Por lo tanto, es necesario identificar las alteraciones moleculares que junto con la infección de VPH promueven la progresión del CACU en el contexto de la respuesta a tratamiento. Gracias al desarrollo de la tecnología de análisis masivos se han caracterizado a nivel global los perfiles de expresión y de alteraciones cromosómicas en CACU. Sin embargo, a la fecha existen pocos estudios sobre perfiles globales de metilación en CACU. El estudio de marcadores de metilación es relevante, ya que a diferencia de las alteraciones genéticas como mutaciones o translocaciones, las alteraciones en la metilación del DNA son potencialmente reversibles. En otros tumores, los patrones de metilación en son considerados como potenciales biomarcadores para el diagnóstico temprano, progresión y respuesta a terapia. Un ejemplo de ello es la determinación de la metilación del

gen *MGMT* como predictor de la respuesta a temozolamida en pacientes con glioblastoma.

En CACU se ha estudiado de manera aislada la metilación de menos del 1% de los genes conocidos. De manera global, son cuatro estudios y no se ha abordado en el contexto de la respuesta a terapia.

Se sabe que las pacientes en etapas iniciales de CACU tienen un buen pronóstico; sin embargo en las etapas localmente avanzadas (IIB a IIIB) sólo el 50% de las pacientes responderán adecuadamente a la terapia con supervivencia a 5 años.

En este trabajo, se realizaron análisis supervisados para determinar perfiles de metilación diferenciales en muestras de pacientes con respuesta a terapia versus pacientes que no responden a terapia, así como análisis de sobrevida global de pacientes con un perfil de metilación específico. Este estudio contribuirá al conocimiento de las alteraciones epigenéticas que se presentan en el desarrollo del CACU, además de obtener potenciales biomarcadores epigenéticos de progresión.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los *loci HOX* cuyo perfil de metilación es diferencial en pacientes con CACU con respuesta a terapia *versus* muestras de pacientes sin respuesta a terapia?

## **HIPOTESIS**

Existe un grupo de *loci HOX* diferencialmente metilado en CACU asociado a la respuesta a terapia.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar a *los loci HOX* cuyo perfil de metilación se asocie a la respuesta a terapia en pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar los *loci HOX* diferencialmente metilados en pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas con respuesta a terapia versus no respuesta.
2. Determinar si existe una relación entre la metilación de los *loci HOX* y la sobrevida global de las pacientes.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Este estudio se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. La población de estudio fueron pacientes con diagnóstico de CACU del tipo histológico epidermoide en etapas localmente avanzadas (IIB y IIIB) atendidas en el Hospital de Oncología.

### ***Muestras biológicas y criterios de inclusión, exclusión y eliminación***

Se obtuvieron 56 muestras de pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas (IIB-IIIB) atendidas en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

- Muestras de pacientes entre 18 y 65 años con diagnóstico de CACU.
- Tipo histológico epidermoide.
- En etapas clínica IIB a IIIB.
- Pacientes sin tratamiento previo que acuden por primera vez al Hospital de Oncología (enviadas de las clínicas de displasias) para iniciar tratamiento.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes que hayan tenido otra neoplasia previa.
- Presencia de alguna infección sistémica aguda grave.
- Pacientes con embarazo o lactando.

## CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que no cumplan el primer ciclo de tratamiento completo.
- Pacientes que no completen un seguimiento de 12 meses a excepción de las pacientes que hayan fallecido a causa del CACU.
- Que el material biológico colectado no sea suficiente para los estudios moleculares planteados.

Se revisó el expediente médico de cada paciente en el área de Archivo Clínico del Hospital de Oncología (CMN S.XXI), para obtener los datos clínicos (etapa clínica, edad, meses de seguimiento, tipo de terapia, esquema de tratamiento, respuesta a terapia) que fueran relevantes para este estudio.

Del total de 56 muestras, se eligieron 22 que se utilizaron para su análisis de metilación con microarreglos (ver más adelante).

### ***Extracción de DNA y control de calidad***

Se realizó la extracción de DNA con el kit DNeasy Blood & Tissue Kit® (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA resultante se cuantificó colocando 2µl de muestra en una placa Take3™ (Biotek) y leída en el espectrofotómetro Epoch® Micro-Volume Spectrophotometer System (Biotek). El coeficiente 260/280 debió ser mayor a 1.7 para que una muestra fuera considerada de buena calidad. Se realizó electroforesis (1h a 90V) en gel de agarosa (1% en buffer Tris-borato-EDTA 1X) para confirmar la integridad del DNA.

### ***Genotipificación de VPH***

Se utilizó el sistema Linear Array Genotyping Test (Roche®) para obtener los tipos virales de cada muestra. Con esta plataforma, es posible identificar 37 tipos virales, incluidos 13 tipos de alto riesgo (VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40,

42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108). Se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron de 200-500 ng de DNA (50µl de volumen) para realizar la PCR (primers PG/MY; condiciones de ciclaje: 1 ciclo de: 50°C 2 min, 95°C 9 min. 40 ciclos de: 95 °C 30 seg, 54°C 45 seg, 72°C 30 seg). Posteriormente, el DNA amplificado se desnaturaliza utilizando 100µl de Buffer de Desnaturalización (Hidróxido de sodio 1.6%; EDTA; azul de timol) a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR es hibridado en tiras sumergidas en buffer de hibridación (4X SSPE [Solución de sodio-fosfato, cloruro de sodio; EDTA]; 0.5% SDS). Las tiras contienen sondas correspondientes a los distintos tipos virales. Se incubaron a 56°C (baño maría) durante 30 minutos en agitación y después se realizó un lavado con buffer de lavado (1X SSPE; 0.1% SDS) a temperatura ambiente y otro lavado con el mismo buffer a 56°C (baño maría) en agitación. Posteriormente, las tiras se sumergieron en Buffer conjugado (Buffer de lavado; Conjugado de estreptavidina–peroxidasa de rábano) y se incubaron 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. Pasada esta incubación, las tiras se lavaron tres veces con Buffer de lavado y se sumergieron en Buffer de Citrato (Concentrado de citratos suplementado por el fabricante) por 5 minutos en agitación. Finalmente, las tiras fueron expuestas al sustrato (Peróxido de Hidrógeno 0.1%; 3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina 0.1%; Dimetilformamida 40%) por 5 minutos y reveladas. Las bandas se interpretaron manualmente.

En el caso de las muestras probadas con Linear Array, pero que resultaron negativas a VPH, se utilizó un segundo sistema: INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (INNOGENETICS®), que reconoce 28 tipos virales. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usaron 30 ng de DNA inicial para la amplificación por PCR (Primers: SPF10; condiciones de ciclaje: 1 ciclo de: 37 °C 10 min. 40 ciclos de: 94 °C 30 seg, 52 °C 45 seg, 72 °C 45 seg. 1 ciclo de: 72°C 5 min). El DNA fue desnaturalizado después de la reacción de PCR usando el buffer de Desnaturalización (solución alcalina con EDTA, suplementada por el fabricante). Para la hibridación, se utilizó el protocolo automatizado en el que el dispositivo LIPA 48® dispensa cada uno de los reactivos, (Buffer de hibridación,

Buffer de lavado, Buffer conjugado y sustrato) y controla la temperatura de manera automática.

### ***Determinación del perfil de metilación de los genes HOX***

Se utilizó una concentración inicial de 800 ng- 1µg de DNA de cada muestra, disueltos en 20µl de agua libre de DNAsas. Se utilizaron solamente muestras de alta calidad (fragmentos mayores a 1000 pb). El DNA fue llevado a la Unidad de Genotipificación y Análisis de expresión del INMEGEN para su procesamiento.

Posteriormente, el DNA fue tratado con bisulfito de sodio, utilizando el Zymo EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research, Orange,CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del tratamiento, las citosinas no metiladas son convertidas en uracilo, mientras que las citosinas metiladas son protegidas de esta modificación.

El DNA tratado fue neutralizado utilizando un buffer de neutralización (0.1N NaOH) y desnaturalizado. Posteriormente, el DNA fue amplificado utilizando una reacción de amplificación de todo el genoma (WGA, por sus siglas en inglés).

El producto amplificado fue digerido con enzimas de restricción. El ensayo utiliza fragmentación de punto final para evitar sobre-digestión. Después, el DNA fue precipitado con isopropanol e incubado a 4°C toda la noche. Posteriormente, el DNA fue recuperado en buffer de hibridación.

Para la hibridación, se utilizaron los microarreglos de metilación Infinium Human Methylation 450 (Illumina®), que contienen más de 487, 000 sitios CpG y cubren 96% de las islas CpG y el 99% de los genes de la base de datos RefSeq. Las muestras fueron dispensadas en las BeadChips del arreglo (12 muestras por cada uno) y se incubaron toda la noche en el Illumina Hybridization Oven (Illumina®). Cada sitio CpG evaluado contiene dos sondas: una para detectar los sitios metilados (G) y otra para los sitios no metilados (T).

Una vez terminada la incubación, se hicieron lavados para eliminar el DNA no hibridado. Se llevó a cabo la extensión de una sola base de cada sonda sobre el arreglo, utilizando al DNA de la muestra como templado. En este paso, se

incorporan los fluoróforos cianina 5 (Cy5) y cianina 3 (Cy3) a las sondas (marcaje). Posteriormente, los arreglos fueron escaneados con el sistema iScan (Illumina®). Se analizaron 1,093 sitios CpG, correspondientes a las islas CpG de los promotores de los genes *HOX*.

### ***Análisis de datos***

Se utilizó el software Partek® Genomics Suite® (Partek®) para normalizar los datos, hacer el análisis estructural de los sitios metilados y no metilados, los análisis de differential score y las agrupaciones jerárquicas.

Se usó el paquete estadístico SPSS (IBM®) para realizar el análisis de estadística descriptiva, análisis de Regresión de Cox (sobrevivencia) y tablas de contingencia.

## **RESULTADOS**

Se analizaron muestras biológicas de 56 pacientes con CACU del tipo histológico epidermoide en las etapas clínicas IIB y IIIB. Del total de muestras, 69% fueron IIB, mientras que 31% corresponden a la etapa IIIB (tabla 4). La media de edad de las pacientes fue 50 años (rango 22-73 años). Del total de casos analizados, el 54% se consideraron de buena respuesta a tratamiento (ausencia de actividad tumoral durante el seguimiento a 5 años); mientras que el 46% presentó una mala respuesta a tratamiento (persistencia o recurrencia de actividad o muerte por actividad tumoral) (NCCN, 2013).

Para determinar si las muestras de DNA presentaban una buena calidad (DNA de alto peso molecular) para su análisis con microarreglos y PCR tiempo real, se realizaron electroforesis de 500 ng de DNA en geles de agarosa al 1%. Se observó que de un total de 56 muestras, 55 presentan una buena calidad de DNA (ver figura 6).

Se determinaron los tipos de VPH en las 55 muestras de CACU de alta calidad. Las frecuencias de los tipos virales encontrados se muestran en la figura 7. El 80.4% de los casos presentaron infecciones únicas de VPH (n=45), siendo VPH16 y VPH18 los tipos más frecuentes (58% y 16%, respectivamente).

**Tabla 4. Características clínicas generales de la población evaluada**

<b>Factor</b>	<b>Frecuencia (n)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b><i>Edad</i></b>	56	100
15-39 años	10	17.9
40-44 años	4	7.1
45-49 años	4	7.1
50-54 años	15	26.8
55-59 años	10	17.9
60-64 años	9	16.1
65-69 años	2	3.6
70-74 años	2	3.6
<b><i>Etapa clínica</i></b>		
IIB	39	69.6
IIIB	17	30.4
<b><i>Tratamiento</i></b>		
RT	26	46.4
RT+CDDP	14	25
RT+GEM	16	28.6
<b><i>Recurrencia a 30 meses</i></b>		
Positiva	5	9.1
Negativa	50	90.9
<b><i>Respuesta a tratamiento</i></b>		
Buena respuesta	30	54
Mala respuesta	26	46

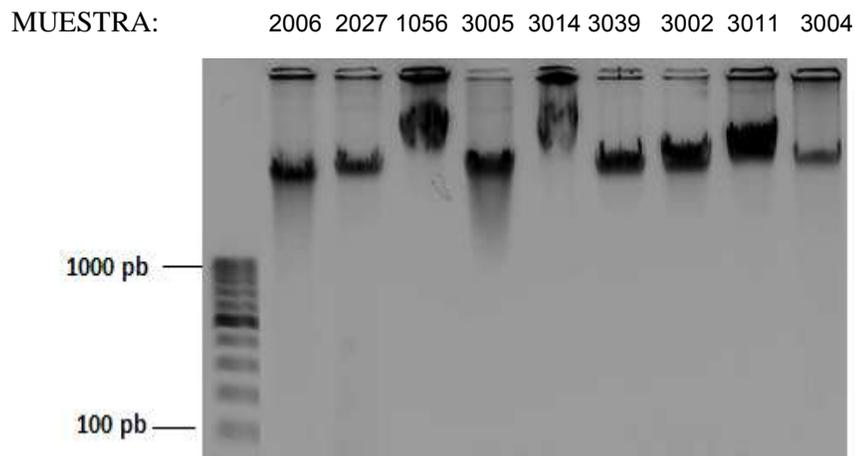
Un 19.6% de los casos presentaron coinfecciones (n=11). El 73% de los casos con infecciones múltiples (8 casos de 11) presentaron VPH16 como uno de los tipos co-infectante

Uno de los hallazgos de la genotipificación es que VPH73 se encuentra en monoinfección en una de las muestras. La IARC (2009) considera a esta tipo viral como probable carcinógeno.

De las 55 muestras genotipificadas, se eligieron 22 con buena calidad y cantidad de DNA para el análisis de metilación con microarreglos (ver Metodología).

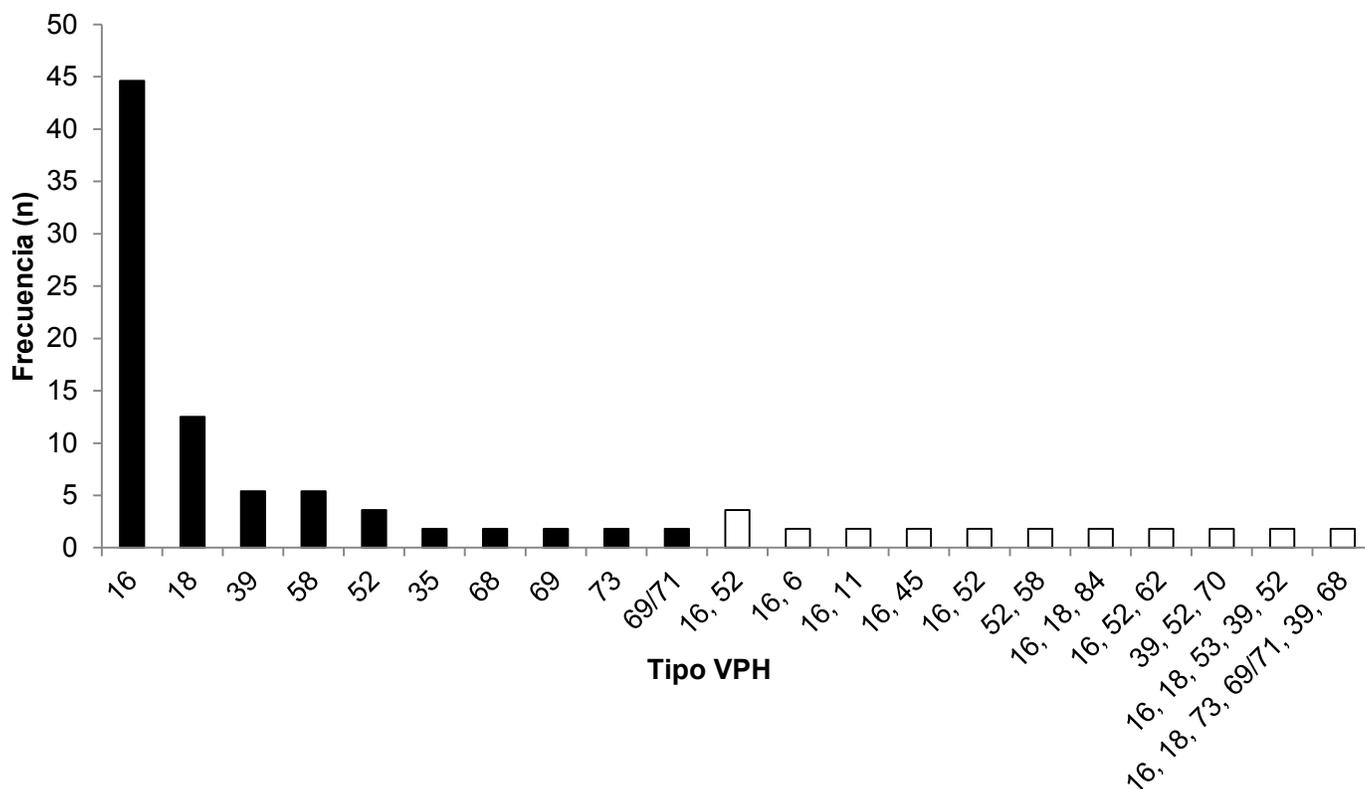
Se obtuvieron 10 muestras correspondientes al grupo de buena respuesta, mientras que 12 muestras corresponden al grupo de mala respuesta.

Se determinó el estado de metilación de 1, 093 sitios CpG correspondientes a las islas dentro de los *loci HOX* en dichas muestras. Se hizo un análisis de Differential Score, en el que se tomaron como referencia los niveles de metilación del grupo de buena respuesta, y se normalizaron a cero.



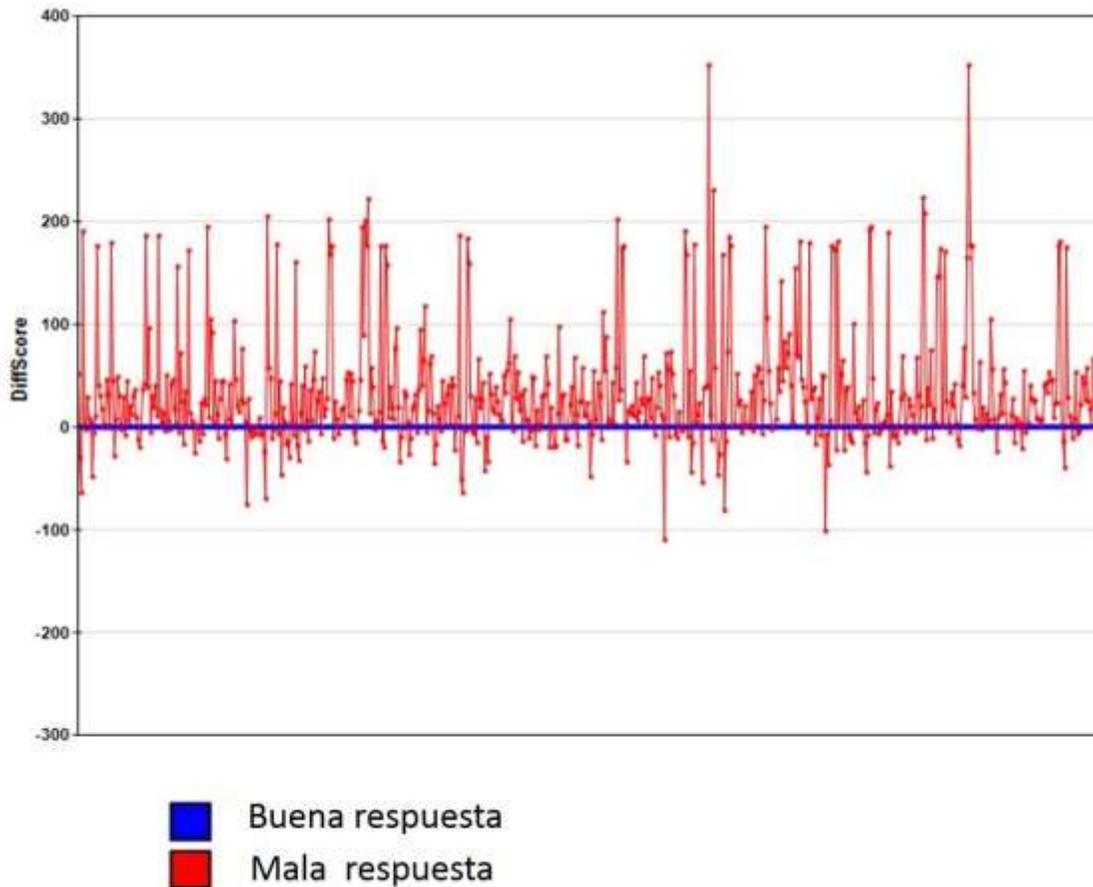
**Figura 6. Electroforesis de DNA total obtenido a partir de muestras de pacientes con CACU.** Se muestra un gel representativo de siete que se realizaron.

Posteriormente, se evalúan los cambios en los niveles de metilación en el grupo de mala respuesta, con respecto al otro grupo. Se observó que, en el grupo de mala respuesta, la mayoría de los sitios analizados se encuentran hipermetilados (figura 8). La mayoría de los sitios presentaron sitios de 50 a 200 veces más metilados comparados con los del grupo de buena respuesta. Dos sitios presentaron una metilación 350 veces mayor con respecto al otro grupo. Se hallaron algunos sitios hipometilados, mismos que no rebasaron las -100 veces en los niveles de metilación.



**Figura 7. Frecuencia de tipos de VPH en las muestras analizadas.** VPH 16 y 18 fueron los tipos virales más frecuentes. VPH 68, 69 y 73 fueron encontradas en monoinfección. 69/71 indica que la muestra puede presentar el tipo viral 69 y/o 71, según el manual del usuario de Inno- LiPa. Las barras negras representan monoinfecciones, mientras que las barras blancas representan coinfecciones.

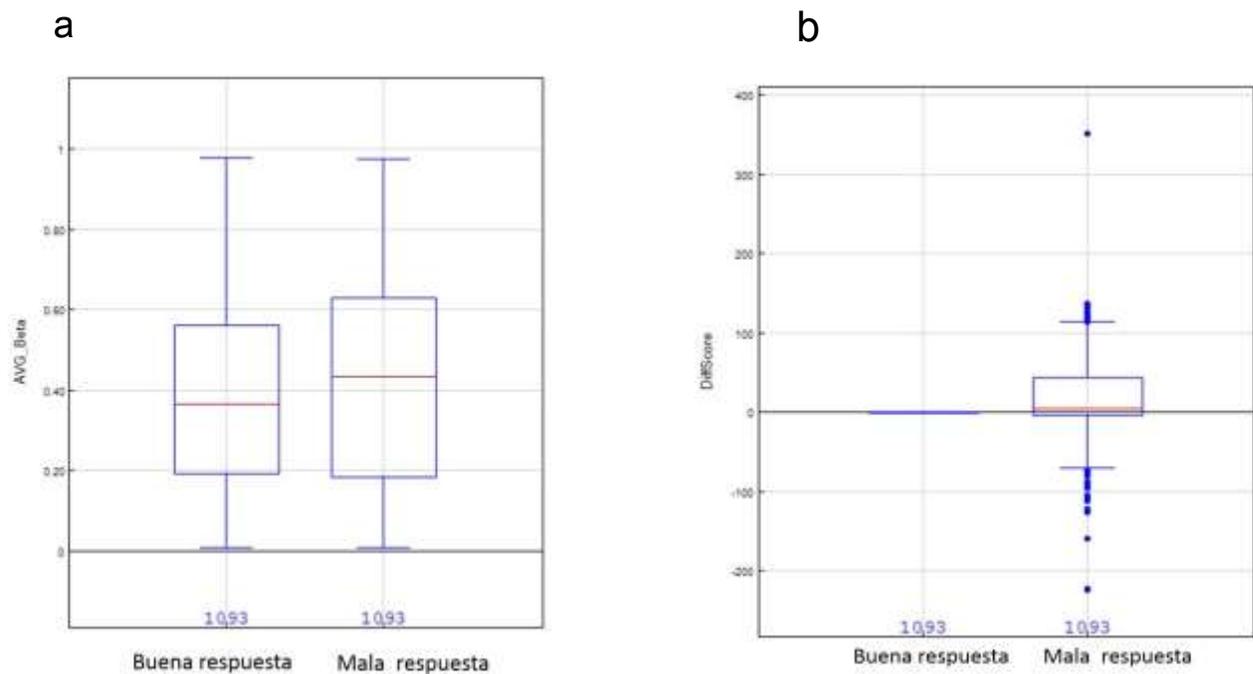
Se realizaron gráficas de caja y bigote utilizando el valor  $\beta$  (nivel de metilación) de los *loci HOX* y el “differential score” (figura 9).. Se observó que hay un ligero incremento en la media de metilación del grupo de mala respuesta (figura 9 a). Se observó una tendencia a la hipermetilación utilizando el “differential score”, aunque los datos muestran una dispersión a la baja.



**Figura 8. Análisis de “Differential Score” de los clusters *HOX* en las muestras de buena y mala respuesta a tratamiento.** La línea azul representa los niveles de metilación de las muestras de buena respuesta, mientras que los histogramas rojos representan los niveles de metilación de las muestras de mala respuesta. Se normalizaron a cero los valores de metilación del grupo de buena respuesta y se realizó el análisis “differential score” en base a dichos valores.

Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado, para identificar los *loci HOX* diferencialmente metilados entre ambos grupos.

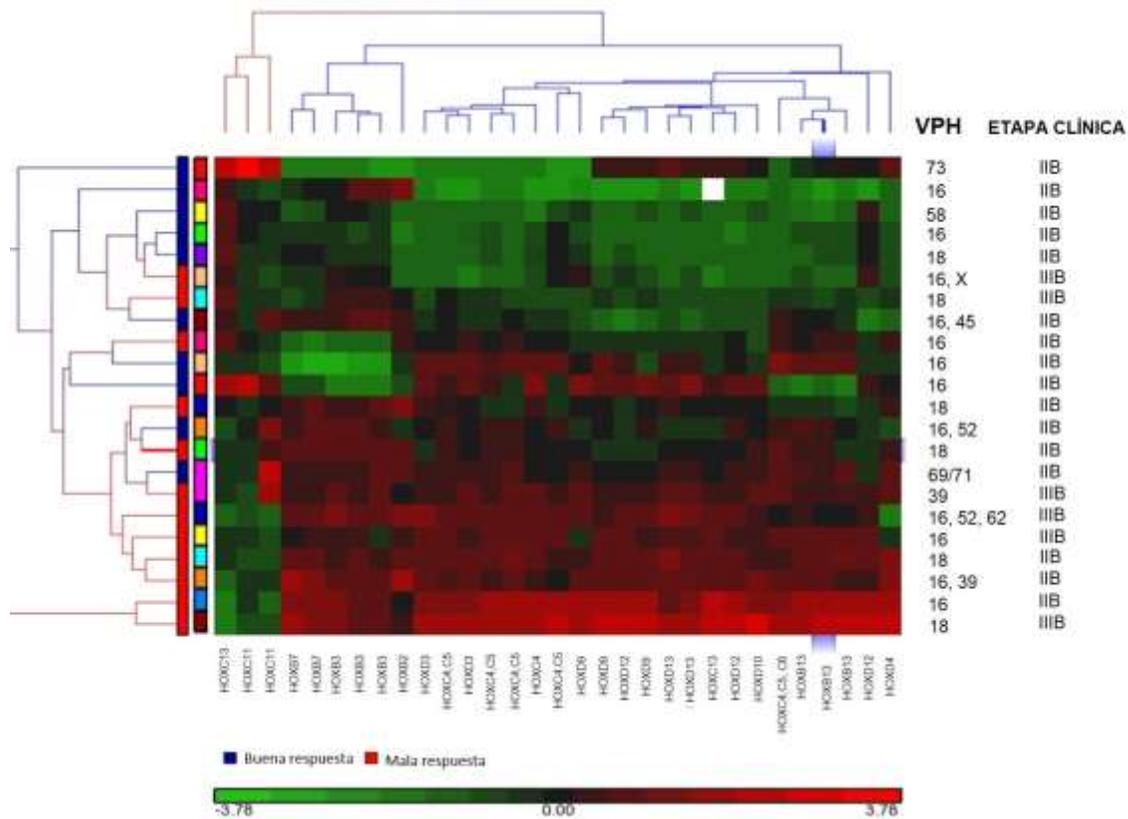
Como se observa en la figura 10, los grupos no se separan perfectamente, pero se puede observar una tendencia de discriminación en dos grupos, correspondientes a los grupos clínicamente definidos como mala y buena respuesta a tratamiento



**Figura 9. Niveles de metilación en las islas CpG asociadas a los *loci HOX* en los grupos de buena y mala respuesta.** Se graficaron los a) valores  $\beta$  y el b) “differential score” del estado de metilación de 1,093 sitios.

Los *loci* diferencialmente metilados entre ambos grupos corresponden a los genes *HOX* de los clusters B, C y D, mientras que en el cluster A no se encontraron diferencias en la metilación. Los *loci HOXC11* y *HOXC13* se encuentran consistentemente hipometilados (ver esquema en figura 11) en las muestras del grupo de mala respuesta, e hipermetilados en algunas muestras del grupo de buena respuesta. Los *loci* consistentemente hipermetilados en el grupo de mala

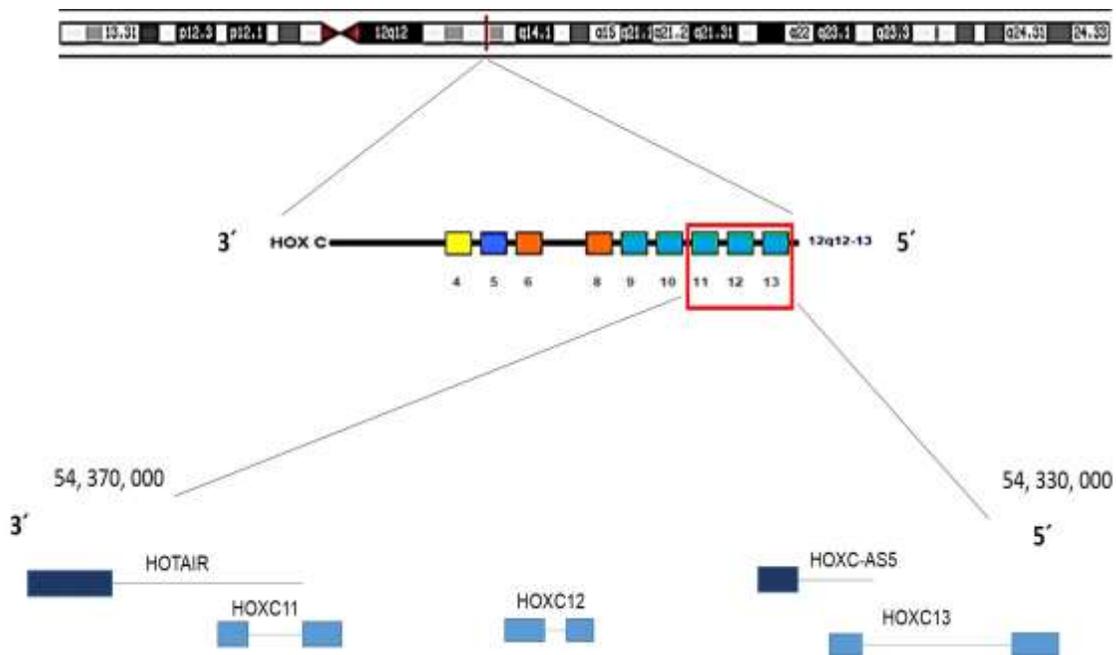
respuesta fueron: *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD12* y *HOXD13*. Estos loci se encuentran hipometilados en el grupo de buena respuesta, en la mayoría de los casos (ver figura 10).



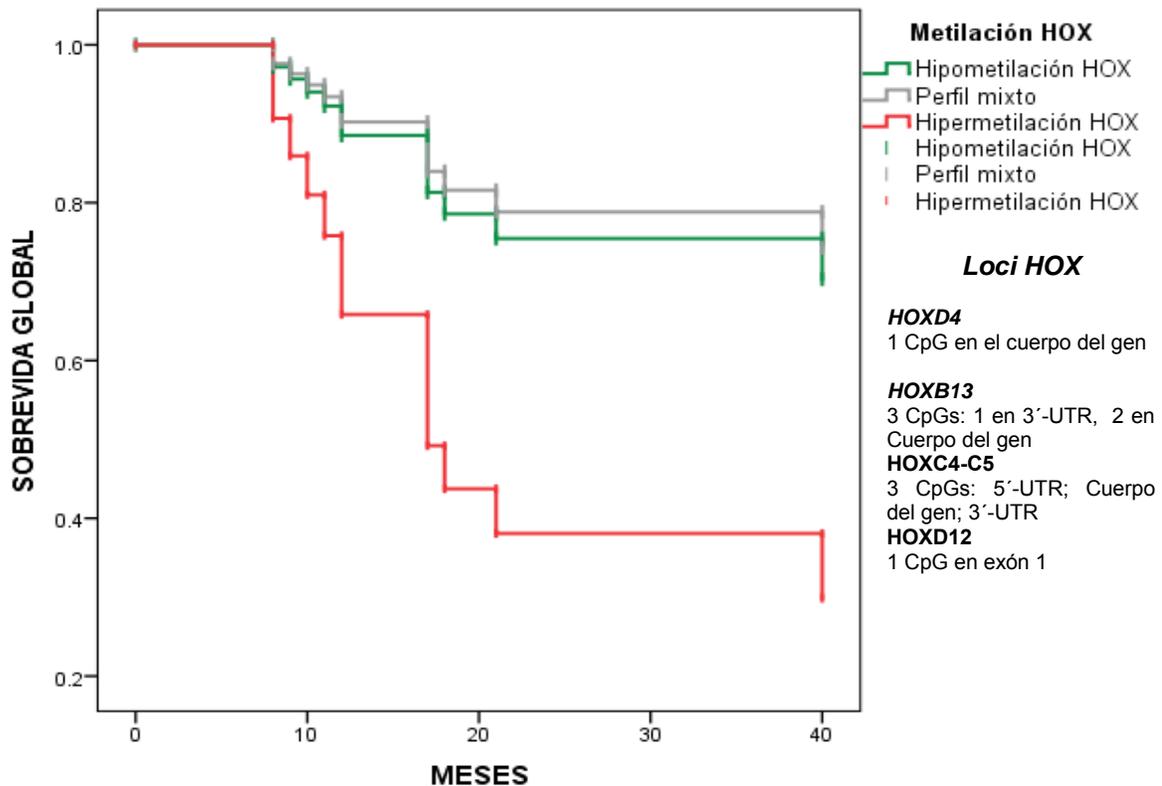
**Figura 10. Agrupamiento jerárquico no supervisado de las muestras de CACU.** Las muestras se agrupan, aunque no de manera completa, en los grupos clínicamente definidos como buena y mala respuesta a tratamiento. En la parte derecha de la figura, se encuentran los tipos virales (VPH) encontrados en cada muestra. El color verde representa bajos niveles de metilación (hipometilación); el color negro significa que no existen diferencias entre ambos grupos; el rojo significa altos niveles de metilación (hipermetilación). El cuadro de color blanco es un valor perdido en el análisis.

Se llevó a cabo un análisis de sobrevida global (regresión de Cox) de las pacientes con CACU en base al estado de metilación de los loci *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12*. Estos loci fueron seleccionados manualmente y de manera cualitativa. Se tomaron los sitios con mayores diferencias cualitativas en la metilación en ambos grupos y se construyeron curvas

de sobrevida global con diferentes conjuntos de sitios CpG. De esta manera, se obtuvo una curva que presenta tendencias claras en la sobrevida global. En la figura 12 podemos observar que las pacientes que presentan hipermetilación en dichos *loci* (*HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12*.) tienen una menor sobrevida global (38%). En contraste, las pacientes que presentan hipometilación en los *loci* *HOX* tienen una mayor sobrevida global (76%). El riesgo relativo (RR) de muerte si presentan hipermetilación en estos sitios fue de 2.4.



**Figura 11.** Esquema de la localización genómica analizada en el presente estudio. Se muestran dos ejemplos, los *loci* *HOXC13* Y *HOXC11*. La información mostrada se basa en la construcción 38 del genoma (UCSC Genome Browser, 2013).



**Figura 12. Sobrevida global de las pacientes con CACU con relación al estado de metilación de los loci HOX.** Se hizo una regresión de Cox para calcular la sobrevida global de las pacientes. La curva fue realizada ajustando por etapa (IIB y IIIB), tipo de tratamiento (RT y RT+CDDP) y tipo de infección de VPH (monoinfección y coinfección).

Aquellas pacientes que presentan un perfil de metilación mixto, con algunos sitios hipermetilados y otros hipometilados en el mismo locus, tienen una sobrevida global similar al grupo de hipometilación. En la Tabla 5 se presentan los sitios CpGs que se encontraron diferencialmente metilados en ambos grupos, y las regiones genómicas donde se encuentran. Cabe destacar que algunos de los sitios CpG diferencialmente metilados asociados a sobrevida (ver figura 12) se encuentran en regiones codificantes (exones, cuerpo del gen) o no codificantes, pero que no necesariamente forman parte del promotor (UTRs).

**Tabla 5. Posiciones genómicas, regiones y estructuras analizadas**

GEN	POSICIÓN CROMOSÓMICA	ID dinucleótido CpG	ESTRUCTURA	REGIÓN	p (BR vs. MR)
HOXD4	chr2:176,151,385-176,153,221	cg16218721	Isla	Cuerpo del gen	0.046
HOXB13	chr17:48,724,765-48,728,749	cg19057986	Isla	3'-UTR	0.045
HOXB13	chr17:48,724,765-48,728,749	cg21865150	Isla	Cuerpo del gen	0.028
HOXB13	chr17:48,724,765-48,728,749	cg16557178	Isla	Cuerpo del gen	0.045
HOXC4	chr12:54,053,877-54,056,030	cg08465346	Isla	5'-UTR	0.027
HOXC4; C5; C5	chr12:54,032,054-54,057,901	cg23618344	Isla	5'-UTR; Cuerpo del gen; 3'-UTR	0.027
HOXC4; C5	chr12:54,032,054-54,057,901	cg18054172	Isla	5'-UTR	0.014
HOXC4; C5	chr12:54,032,054-54,057,901	cg18843682	Isla	5'-UTR	0.022
HOXC4; C5	chr12:54,032,054-54,057,901	cg00040312	Isla	5'-UTR	0.013
HOXC11*	chr12:53,973,126-53,976,419	cg12599390	Isla	ND	0.044
HOXC11*	chr12:53,973,126-53,976,419	cg02510471	Isla	Cuerpo del gen	0.048
HOXC13*	chr12:53,938,792-53,946,544	cg08803500	Isla	ND	0.038
HOXD3	chr2:176,164,077-176,173,098	cg06145336	Isla	TSS-873	0.029
HOXD3	chr2:176,164,077-176,173,098	cg13316854	Isla	TSS 1500	0.029
HOXD9	chr2:176,122,685-176,124,917	cg10753836	Isla	3'-UTR	0.019
HOXD9	chr2:176,122,685-176,124,917	cg14410016	Isla	TSS 1500	0.030
HOXD9	chr2:176,122,685-176,124,917	cg08363794	Isla	TSS 1500	0.021
HOXD10	chr2:176,116,764-176,119,942	cg02249732	Isla	Exón 1	0.039
HOXD12	chr2:176099802-176100760	cg23130254	Isla	Exón 1	0.035
HOXD12	chr2:176099802-176100760	cg02694427	Isla	TSS 200	0.025
HOXD12	chr2:176099802-176100760	cg03371669	Isla	Exón 1	0.033
HOXD13	chr2:176,092,804-176,095,938	cg10418524	Isla	TSS 1500	0.039
HOXD13	chr2:176,092,804-176,095,938	cg07802350	Isla	TSS 1500	0.036

Se presentan los sitios CpG diferencialmente metilados en el grupo de mala respuesta clínica, los genes asociados a dichos sitios, la posición cromosómica de los genes, las estructuras regulatorias y regiones genómicas en donde se encuentran los sitios CpG. En la última columna se muestra el valor de p, al comparar los niveles de metilación de ambos grupos. El asterisco \* marca a los *loci* hipometilados. ND: datos no disponibles. BR: Buena Respuesta. MR: Mala Respuesta.

Posteriormente, se realizó un análisis con la prueba exacta de Fischer (F) para determinar si el estado de metilación de los *loci* *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12* están asociados con las variables clínicas de las pacientes con CACU, como la edad, etapa, recurrencia a 30 meses, el tipo de VPH y el tipo de infección (monoinfección y coinfección). Como se observa en la tabla 6, la recurrencia tuvo una asociación significativa con el estado de metilación de los *loci* antes mencionados (*HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12*). El resto de las variables clínicas no presentó una correlación significativa con el estado de metilación.

**Tabla 6. Asociación del perfil de metilación de los *loci* *HOX* con variables clínicas**

Variable clínica	Hipometilación HOX/Perfil mixto	Hipermetilación HOX	p
<b>Edad</b>	<b>n (%)</b>	<b>n(%)</b>	
<25años	0 (0)	1 (11.1)	0.447
25-49años	4 (30.8)	3 (33.3)	
50-75años	9 (69.2)	5 (55.6)	
<b>Etapa clínica</b>			
IIB	11 (84.6)	5 (55.6)	0.132
IIIB	2 (15.4)	4 (44.4)	
<b>Recurrencia a 30 meses</b>			
Viva sin recurrencia	10 (76.9)	1 (11.1)	0.007
Viva con recurrencia	0 (0)	2 (22.2)	
Muerta	3 (23.1)	6 (66.7)	
<b>Tipo viral</b>			
VPH16	7 (53.8)	5 (55.6)	0.731
VPH18	3 (23.1)	3 (33.3)	
OTROS	3 (23.1)	1 (11.1)	
<b>Infección</b>			
Monoinfección	10 (76.9)	8 (88.9)	0.616
Coinfección	3 (23.1)	1 (11.1)	

Se realizó la prueba exacta de Fischer (F) para determinar la asociación de las variables clínicas con la metilación de los *loci* *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD4* y *HOXD12*.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó el perfil de metilación de los *loci HOX* de 22 muestras de pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas que clínicamente presentaron buena y mala respuesta a tratamiento basada en RT y RT+CDDP. Hasta el momento, este es el primer trabajo que evalúa dicho perfil de metilación y su asociación con la respuesta a tratamiento en CACU.

En estudios previos, se demuestra que la hipermetilación de islas CpG está asociada con la agresividad y progresión de los tumores sólidos (Tang, 2000; Szif *et al*, 2012; Jang y Park, 2013). En el presente estudio, la mayoría de los sitios analizados en las muestras del grupo de mala respuesta se encontraron hipermetilados (ver figuras 8 y 9). Esta evidencia sugiere que la hipermetilación de algunos sitios CpG, además de asociarse con agresividad y progresión de tumores, se relaciona con una mala respuesta a tratamiento en CACU.

Los *loci* hipermetilados asociados a mala respuesta a tratamiento fueron: *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB7*, *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD12* y *HOXD13*. Mostramos que la hipermetilación de algunos *loci HOX* (*HOXD4*, *HOXB13*, *HOXC4-C5* y *HOXD12*) se asocia con una menor supervivencia global, en comparación con pacientes que presentan hipometilación de estos genes. Hasta el momento, este es el primer estudio que asocia la hipermetilación de estos genes con un efecto negativo en la supervivencia global de pacientes con cáncer.

Ningún gen del cluster A presenta metilación diferencial entre ambos grupos, lo cual es relevante debido a que *HOXA* se encuentra hipermetilado en cáncer de mama, y leucemia mieloide aguda (Novak *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 2015), por mencionar algunos ejemplos. Este aparente contraste puede deberse a varios factores, como 1) distintos mecanismos de regulación epigenética (marcas de histonas, interacciones de largo alcance); 2) regulación por receptores nucleares, como el receptor de ácido retinoico; 3) Auto-regulación por otros factores de transcripción *HOX*. Algunos genes del cluster A participan en la diferenciación del aparato genital-urinario, tal es el caso de *HOXA10*, *HOXA11* y *HOXA13*. Defectos en estos genes pueden inducir la transformación anterior, de útero a oviducto.

Otra de las posibilidades es que la metilación del cluster A sea diferencial al comparar tejido de cérvix sano con CACU, lo cual sugeriría que la metilación de *HOXA* es relevante para la carcinogénesis, pero no para el pronóstico clínico y/o la respuesta a tratamiento.

En células de cáncer de mama, *HOXB2* funciona como un inhibidor del crecimiento tumoral (Boimel *et al.*, 2011). En otro estudio, se reportó que la sobreexpresión de *HOXB2* está asociada con un peor pronóstico clínico en pacientes con cáncer de pulmón (etapa I), que aquellos con baja expresión (Inamura *et al.*, 2007). En el presente estudio, encontramos que las pacientes con mala respuesta a tratamiento presentan sitios CpGs hipermetilados. En contraste, la proteína *HOXB2* se encuentra sobre-expresada en CACU, y se asocia a la infección por VPH (González-Herrera *et al.*, 2015). Estas evidencias sugieren que: o bien los sitios CpG hipermetilados no son relevantes para el silenciamiento de la expresión y, por lo tanto, *HOXB2* se encuentra sobre-expresado; o la proteína *HOXB2* participa en la carcinogénesis de CACU, como muestran los resultados de González-Herrera *et al.* (2015) pero su expresión declina en etapas más avanzadas por la metilación de determinados sitios CpG. Como mostraron Boimel *et al.*, (2015). *HOXB2* inhibe el crecimiento del tumor por mecanismos aún por determinar. Esto podría sugerir que, al estar hipermetilado *HOXB2* y posiblemente silenciado, el tumor crece sin esta restricción parcial, y esto en cambio, afecta a la respuesta de la paciente. Estas evidencias soportan una asociación entre la metilación de estos sitios CpG (ver tabla 5) y la respuesta a tratamiento que debe ser estudiada con más detalle en estudios posteriores.

Un reporte muestra que la sobreexpresión de *HOXB3* está asociada con una menor sobrevida global en pacientes con cáncer de próstata, y que promueve la proliferación de células de cáncer próstata y la migración *in vitro* (Chen *et al.*, 2013). En contraste, Xavier *et al.*, (2014) reporta que *HOXB3*, junto con otros genes del cluster B, se encuentran metilados en células de carcinoma oral. Es posible que *HOXB3* se encuentre metilado y sobre-expresado, sin embargo es necesario realizar otros estudios que lo confirmen. Otra posibilidad es que en el

modelo de CACU, a diferencia de cáncer de próstata, el transcrito HOXB3 se encuentre silenciado. Un estudio de Tomioka *et al.*, (2010) muestra que pacientes con cáncer gástrico que presentan deleciones en el *locus HOXB3* tienen una menor sobrevida global, lo cual corresponde con nuestros resultados. En este caso, la pérdida de *HOXB3* sea por deleción o por metilación, tendría una repercusión negativa en la sobrevida de los pacientes.

Un reporte muestra que el nivel de expresión de HOXB7 es menor en pacientes con cáncer de mama con ganglios linfáticos positivos, comparado con pacientes con ganglios linfáticos negativos, por lo que los autores sugieren un papel relevante de HOXB7 en la progresión de dichos tumores (Makiyama *et al.*, 2005).

Raval *et al.*, (2007) reportan que la proteína HOXB7 reprime la expresión del gen *DAPK1* en células de leucemia linfocítica crónica. HOXB7 interactúa con algunas proteínas de la maquinaria de reparación del DNA, como Ku70, Ku80, DNA-PK y participa en la reparación de rompimientos de doble cadena del DNA (Rubin *et al.*, 2007).

HOXB7 juega un papel dual en la carcinogénesis de mama. En un estudio con ratones transgénicos que sobreexpresan HER2 y HOXB7, éste retrasa la aparición de tumores en la mama y reduce el número de tumores. Sin embargo, consistente con los datos clínicos, una vez que aparecieron los tumores, su crecimiento fue más rápido y se presentaron metástasis a pulmón una frecuencia mayor (Chen *et al.*, 2008). La sobreexpresión de HOXB7 se correlaciona con proliferación y tumorigénesis en cáncer colorectal, por lo que se sugiere que podría utilizarse como un biomarcador pronóstico en esos tumores (Liao *et al.*, 2011). El silenciamiento del gen *HOXB7* promueve la progresión de estos tumores mediante la inducción de la proliferación y metástasis (Yuan *et al.*, 2014).

La sobreexpresión de HOXB13 es un marcador de buena respuesta a tamoxifen en pacientes con cáncer de mama (Jansen *et al.*, 2007; Jerevall *et al.*, 2008). El promotor de HOXB13 se encuentra hipermetilado en tumores colorectales. Un análisis de las propiedades supresoras de tumor de HOXB13 reveló que éste

inhibe la proliferación y supervivencia de las células de cáncer de colon *in vitro* e inhibe el crecimiento del tumor en ratones (Ghoshal *et al.*, 2010). Estas evidencias corresponden con nuestros resultados. Al estar HOXB13 metilado y posiblemente silenciado, no puede llevar a cabo su función como inhibidor de la proliferación y supervivencia tumoral, lo cual se refleja en un decremento en la sobrevida global y en la respuesta a tratamiento de las pacientes.

Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio, es que los genes *HOXC4* y *HOXC5* se encuentran hipermetilados en el grupo de mala respuesta a tratamiento. Estos genes pertenecen a los grupos Deformed (Dfd) y Sex Combs Reduced (Scr) de *D. melanogaster*, que se encargan del desarrollo y diferenciación cefálica, maxilar y torácica del embrión (Pattatucci y Kaufman, 1991; Restifo y Merrill, 1994).

El transcrito *HOXC4* se expresa en queratinocitos diferenciados, mientras que en tumores no diferenciados, su expresión disminuye (Rieger *et al.*, 1994). Los autores de este estudio sugieren que el decremento en la expresión de *HOXC4* está relacionada con la indiferenciación. En el presente estudio, *HOXC4* se encuentra hipermetilado y posiblemente silenciado en el grupo de mala respuesta, lo cual sugiere que este grupo de pacientes podría poseer tumores poco diferenciados y, por lo tanto, más agresivos, lo cual se reflejaría negativamente en la respuesta.

*HOXC5* se encuentra selectivamente expresado en células de cáncer de cérvix (Siha), en comparación con tejido normal, en donde se encuentra silenciado (Alami *et al.*, 1999). En este estudio, encontramos que *HOXC5* se encuentra hipermetilado y posiblemente silenciado en el grupo de mala respuesta, e hipometilado y posiblemente expresado en el grupo de buena respuesta. Estos resultados, junto con los de Alami *et al.* (1999), sugieren que, o bien *HOXC5* se activa en un grupo de tumores, y que se silencia en otros que tienen un fenotipo más agresivo; o existe otro mecanismo de regulación de la expresión.

Los *loci* *HOXC11* y *HOXC13* se encuentran hipometilados, y posiblemente activos, en el grupo de mala respuesta (ver tabla 5). Previamente, se ha reportado que estos genes se encuentran sobre-expresados en CACU y otros tumores, como mama, melanomas, liposarcomas y amelosarcomas (López *et al.* 2006; Cantile *et al.*, 2013, Cantile *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2010). *HOXC11* se asocia a proliferación y progresión, así como a resistencia a fármacos. Se demostró que *HOXC11* y *SRC-1* cooperan para regular la expresión de la proteína *S100 beta* en células de cáncer de mama resistentes a tamoxifén. *HOXC11* y *S100 beta* son factores predictivos de mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama (McIlroy *et al.*, 2010). Estos datos sugieren que *HOXC11* y *HOXC13* se encuentran expresados, y que podrían inducir la proliferación y progresión del tumor, así como la resistencia a fármacos, impactando directamente a la respuesta a tratamiento de las pacientes.

La sobre-expresión de *HOXD9* se ha asociado a incremento en proliferación, mal pronóstico y quimioresistencia en pacientes con glioblastoma (Okamoto *et al.*, 2007; Tabuse *et al.*, 2011; Murat, *et al.*, 2008). Sin embargo, no se ha establecido si los cambios en la expresión de dichos genes se asocian con mecanismos de regulación epigenética como la metilación del DNA.

En un estudio con pacientes de melanoma, se demostró que la hipermetilación de *HOXD9* se relaciona con una menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (Marzese *et al.*, 2014). En este mismo reporte, se demostró que los niveles de metilación de *HOXD9* son mayores conforme avanza la enfermedad, siendo más altos en tumores secundarios (metástasis). Los autores sugieren que *HOXD9* juega un papel relevante en la tumorigénesis y la metástasis. Otro estudio muestra que uno de los blanco transcripcionales de *HOXD9* es caderina 1 (*CDH1*), por lo que la hipermetilación y silenciamiento de *HOXD9* puede tener efectos en la expresión de *CDH1*. En CACU, la hipermetilación de *HOXD9* podría tener un papel relevante en la progresión de la enfermedad por medio de la regulación negativa de genes como *CDH1*.

*HOXD10* es un gen abdominal B que se encuentra sobre-expresado en pacientes con cáncer de mama y con glioblastoma multiforme. En estos últimos, se sobre-expresa en pacientes con mala respuesta a quimioterapia (Gaspar *et al.*, 2010). Otro estudio reportó que *HOXD10* se encuentra hipermetilado en cáncer gástrico y que su re-expresión reduce la viabilidad celular. Algunos de sus blancos transcripcionales son: IGFBP3, caspasa3 y caspasa 8 (Wang *et al.*, 2012). Los autores proponen a *HOXD10* como un supresor de tumores candidato. En muestras de cáncer de mama y endometrio, los niveles del transcrito *HOXD10* disminuyen a medida que la enfermedad progresa. En células de cáncer de mama, la re-expresión de *HOXD10* impide la migración celular e induce una reversión fenotípica, reduce la expresión de la integrina  $\alpha 3$  y reduce la proliferación celular. Al inyectar células de cáncer de mama en ratón, la re-expresión de *HOXD10* reduce el tamaño del tumor (Carrio, *et al.*, 2005).

Estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados. *HOXD10*, al estar hipermetilado y posiblemente inactivo, es incapaz de activar las vías apoptóticas, de reducir la proliferación y detener el crecimiento tumoral, lo cual promueve la viabilidad del tumor y posiblemente, su capacidad de responder al tratamiento.

Uno de los genes blanco de *HOXD13* es el receptor de efrina A7 (*EPHA7*), que es regulado a la baja. *EPHA7* regula vías de señalización involucradas en proliferación e inducción de apoptosis (Salsi y Zappavigna, 2006).

Algunos reportes de expresión global encontraron que *HOXD13* se encuentra co-expresado junto con *CDK6* (Burington *et al.*, 2009). Otro reporte muestra que *HOXD13* está co-localizado con *CDK4* (Schadt, *et al.*, 2004). Ambos genes contienen elementos de respuesta *HOX* en sus promotores (Eukaryotic Promoter Database, 2015), por lo que *HOXD13* podría regular a nivel transcripcional a *CDK4* y *CDK6*, aunque es necesario realizar otros estudios para demostrarlo. Cantile *et al.*, (2009) reportaron que el mRNA *HOXD13* se encuentra sobre-expresado en CACU. Nosotros caracterizamos la hipermetilación de *HOXD13* en este estudio, por lo que: A) *HOXD13* se sobre-expresa en un grupo de tumores, y se silencia en otros que tienen un fenotipo más agresivo; B) la metilación no

regula la expresión. En este caso, otros mecanismos (como la modulación por dominios nucleares, marcas de histonas y ncRNAs) podrían ser responsables de esta regulación génica.

Es necesario llevar a cabo estudios con mayor número de muestras para validar los hallazgos del presente estudio y para relacionar el estado de metilación con la expresión de mRNA y/o proteínas.

La evidencia revisada anteriormente, juntos con nuestros resultados, sugieren que los genes *HOX* tienen un papel relevante en la respuesta a tratamiento en CACU. Esto, a su vez, sugiere una regulación de genes involucrados en la resistencia a fármacos, proliferación, progresión, invasividad y metástasis. Los genes blanco de los factores de transcripción *HOX* no han sido caracterizados ampliamente, por lo que es necesario llevar a cabo estudios que caractericen los blancos transcripcionales de las proteínas *HOX*, en presencia de fármacos y/o radiación, para así dilucidar los mecanismos involucrados en la respuesta a tratamiento que involucren a dichos factores de transcripción.

## **CONCLUSION**

La hipermetilación de los *loci HOXB2, HOXB3, HOXB13, HOXC4, HOXC5, HOXC6, HOXD3, HOXD4, HOXD9, HOXD10, HOXD12* y *HOXD13* se asocia con una mala respuesta a tratamiento en pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas. A pesar de que se utilizó un número pequeño de muestras, se observó una tendencia asociada a la sobrevida global menor en pacientes que presentan hipermetilación de los *loci HOXB13, HOXC4-C5, HOXD4* y *HOXD12*. Para poder confirmar esta tendencia y validar nuestros resultados, es necesario analizar el estado de metilación de estos genes en un mayor número de muestras.

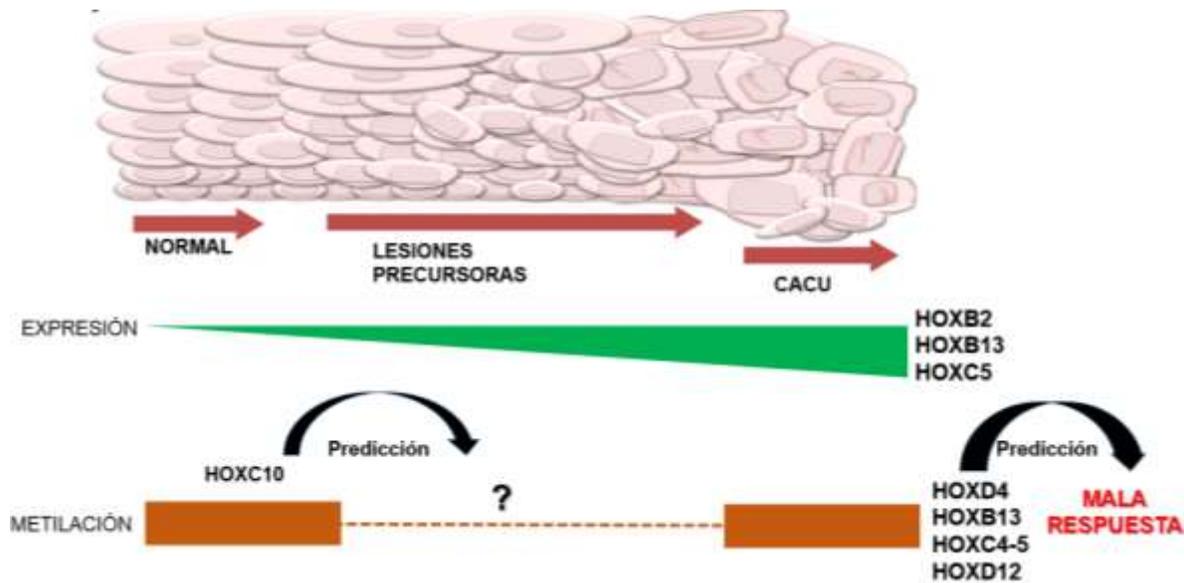


Figura 13. Genes *HOX* diferencialmente expresados en la progresión de CACU y diferencialmente metilados en la respuesta a tratamiento.

## Perspectivas

1. Validar el perfil de metilación de los *loci* *HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXC6*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD12* y *HOXD13* hipermetilados utilizando otras metodologías, como bisulfito y secuenciación.
2. Identificar si el estado de metilación de los *loci* *HOX* (*HOXB2*, *HOXB3*, *HOXB13*, *HOXC4*, *HOXC5*, *HOXC6*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD12* y *HOXD13*) se relaciona con la expresión de mRNA y/o proteínas.
3. Validar la tendencia de una menor sobrevida global en las pacientes que presentan hipermetilación en los *loci* *HOXB13*, *HOXC4-C5*, *HOXD4* y *HOXD12* en un mayor número de muestras. Este perfil de metilación, puede utilizarse en un futuro, como marcador de respuesta a tratamiento en pacientes con CACU en etapas localmente avanzadas.

4. Realizar estudios funcionales que permitan dilucidar los blancos transcripcionales y mecanismos de regulación mediados por los *HOX*, así como su papel en la respuesta a tratamiento a nivel molecular.

## LITERATURA CITADA

- Alami Y, Castronovo V, Belotti D, Flagiello D, Clausse N. (1999). HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*21; 257(3):738-45.
- Antequera, Boyes J, Bird A. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*; 62:503-514.
- Bachtary B, Schindl M, Pötter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, Birner P. (2003). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Clin Cancer Res.* Jun; 9(6):2234-40.
- Bai LX, Wang JT, Ding L, Jiang SW, Kang HJ, Gao CF, Chen X, Chen C, Zhou Q.(2014). Folate deficiency and FHIT hypermethylation and HPV 16 infection promote cervical cancerization. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 15(21):9313-7.
- Bennett LB, Schnabel JL, Kelchen JM, Taylor KH, Guo J, Arthur GL, Papageorgio CN, Shi H, Caldwell CW. (2009). DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.*;48(9):828-41.

- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. Apr 21; 125(2):315-26.
- Boimel PJ, Cruz C, Segall JE. (2011). A functional in vivo screen for regulators of tumor progression identifies HOXB2 as a regulator of tumor growth in breast cancer. *Genomics*.;98(3):164-72
- Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. (2008) Epidemiology and natural history of human papillomavirus Infections and type-specific Implications in Cervical Neoplasia. *Vaccine*; 26 Suppl.:K1–15.
- Brebi P, Hoffstetter R, Andana A, Ili CG, Saavedra K, Viscarra T, Retamal J, Sanchez R, Roa JC. (2014). Evaluation of ZAR1 and SFRP4 methylation status as potentials biomarkers for diagnosis in cervical cancer: exploratory study phase I. *Biomarkers*;19(3):181-8.
- Buck CB, Day PM, Trus BL. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*; 445(1-2):169-74.
- Burington B, Barlogie B, Zhan F, Crowley J, Shaughnessy JD Jr. (2008). Tumor cell gene expression changes following short-term in vivo exposure to single agent chemotherapeutics are related to survival in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 1;14(15):4821-9.
- Burri P, Djonov V, Aebbersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, Mazzucchelli L, Greiner RH, Gruber G. (2003). Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1alpha with treatment outcome in cervical cancer

treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Jun 1;56(2):494-501.

- Perez CA, Grigsby, Nene SM, Camel HM, Galakatos A, Kao MS, Lockett MA. (1992).Effect of tumor size on the prognosis of carcinoma of the uterine cervix treated with irradiation alone. *Cancer* 69(11), 2796–2806
- C.M. West, S.E. Davidson, S.A. Roberts, R.D. Hunter. (1997).The independence of intrinsic radiosensitivity as a prognostic factor for patient response to radiotherapy of carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 76(9), 1184–1190
- Candelaria M, et al. (2010). Epigenetic therapy and cisplatin chemoradiation in FIGO stage IIIB cervical cancer. *Eur J Gin Onc* 31(4):386-391.
- Cantile M, et al.(2009). HOX D13 expression across 79 tumor tissue types. *International J Can* 25(7):1532-41.
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycombgroup silencing. *Science* 298: 1039–1043.
- Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. (2005).Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res.* 15; 65(16):7177-7185.
- Chakraborty C, Dutta S, Mukherjee N, Samadder S, Roychowdhury A, Roy A, Mondal RK, Basu P, Roychoudhury S, Panda CK. (2015). Inactivation of PTCH1 is associated with the development of cervical carcinoma: clinical and prognostic implication. *Tumour Biol.* 36(2):1143-54.

- Chaopatchayakul P, Jearanaikoon P, Yuenyao P, Limpaboon T. (2010). Aberrant DNA methylation of apoptotic signaling genes in patients responsive and nonresponsive to therapy for cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* ; 202(3):281.e1-9.
- Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. (2008). Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol.* 10; 26(35):5802-12.
- Chen H, Lee JS, Liang X, Zhang H, Zhu T, Zhang Z, Taylor ME, Zahnow C, Feigenbaum L, Rein A, Sukumar S. (2008). Hoxb7 inhibits transgenic HER-2/neu-induced mouse mammary tumor onset but promotes progression and lung metastasis. *Cancer Res.* 68(10):3637-44.
- Chen HH, Su WC, Chou CY, Guo HR, Ho SY, Que J, Lee WY. (2005). Increased expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 is associated with poor survival in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* Nov 15;63(4):1093-100.
- Chen J, Zhu S, Jiang N, Shang Z, Quan C, Niu Y. HoxB3 promotes prostate cancer cell progression by transactivating CDCA3. (2013). *Cancer Lett.*28;330(2):217-24.
- Chen LN, Rubin RS, Othepa E, Cer C, Yun E, Agarwal RP, Collins BT, McGeagh K, Pahira J, Bandi G, Kowalczyk K, Kumar D, Dritschilo A, Collins SP, Bostwick DG, Lynch JH, Suy S. (2014). Correlation of HOXD3 promoter hypermethylation with clinical and pathologic features in screening prostate biopsies. *Prostate.*;74(7):714-21.

- Chou CY, Wang ST, Kuo HC, Tzeng CC, Yao BL. (1994). Serum level of squamous cell carcinoma antigen and tumor size are useful to identify preoperatively patients at high risk of cervical cancer. *Cancer*. Nov 1;74(9):2497-501.
- Chua KL, Hjerpe A. (1996). Persistence of human papillomavirus (HPV) infections preceding cervical carcinoma. *Cancer*. 1;77(1):121-7.
- Coronel J, Cetina L, Pacheco I, Trejo-Becerril C, González-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Arias-Bofill D, Candelaria M, Vidal S, Dueñas-González A. (2011). A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med Oncol*; 28 Suppl 1:S540-6.
- Cross SH, Bird AP. (1995). CpG islands and genes. *Curr. Opin. Genet. Dev*;, 5:309–314.
- D.S. Kapp, D. Fischer, E. Gutierrez, E.I. Kohorn, P.E. Schwartz. (1983). Pretreatment prognostic factors in carcinoma of the uterine cervix: a multivariable analysis of the effect of age, stage, histology and blood counts on survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 9(4), 445–455
- Daftary. (2011). *Manual of Obstetrics*, pp.1-16.
- de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*; 7(5):663-76.

- De Strooper LM, van Zummeren M, Steenbergen RD, Bleeker MC, Hesselink AT, Wisman GB, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. (2014). CADM1, MAL and miR124-2 methylation analysis in cervical scrapes to detect cervical and endometrial cancer. *J Clin Pathol.* ;67(12):1067-71.
- Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, Zorn E, Holzhausen HJ, Haensgen G. (2008). Prognostic impact of HIF-1alpha expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol. Mar*;184(3):169-74.
- DiMaio D, Petti LM. (2013). The E5 proteins. *Virology.*; 445(1-2):99-114.
- Doll CM, Winter K, Gaffney DK, Ryu JK, Jhingran A, Dicker AP, Weidhaas JB, Miller BE, Magliocco AM. (2013). COX-2 expression and survival in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy and celecoxib: a quantitative immunohistochemical analysis of RTOG C0128. *Int J Gynecol Cancer.* Jan;23(1):176-83.
- Doorbar J. (2013). The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*; 445(1-2):80-98
- Dreos R, Ambrosini G, Périer RC, Bucher P. (2015). The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.*; 43(Database issue):D92-6.
- Du K, Gong HY, Gong ZM. (2014). Influence of serum VEGF levels on therapeutic outcome and diagnosis/prognostic value in patients with cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.*;15(20):8793-6.

- Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E.(2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Can*; 4:38.
- Dueñas-González A. (2010). Epigenetic therapy and cisplatin chemoradiation in FIGO stage IIIB cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.*; 31(4):386-91.
- Ebert MP, et al. (2012). TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *N Engl J Med*; 5; 366(1):44-53.
- Eklund E. (2011). The role of HOX proteins in leukemogenesis: insights into key regulatory events in hematopoiesis. *Crit Rev Onco*; 16 (1-2):65-76.
- Elit L, Fyles AW, Oliver TK, Devrie-Aboud MC, Fung-Kee-Fung M. (2010). Follow-up for women after treatment for cervical cancer. *Curr Oncol*;17:65-9.
- Ellis, H. (2011). "Anatomy of the uterus".*Anaesthesia & Intensive Care Medicine*12 (3): 99–101.
- Erfurth FE, Popovic R, Grembecka J, Cierpicki T, Theisler C, Xia ZB, Stuart T, Diaz MO, Bushweller JH, Zeleznik-Le NJ. (2008). MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27; 105(21):7517-22.
- Esteller M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21(35):5427-40.
- F.B. Stehman, B.N. Bundy, P.J. DiSaia, H.M. Keys, J.E. Larson, W.C. Fowler. (1991).Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. I. A multi-variate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 67(11), 2776–2785

- Fanti L, Perrini B, Piacentini L, Berloco M, Marchetti E, Palumbo G, Pimpinelli S. (2008)The trithorax group and Pc group proteins are differentially involved in heterochromatin formation in Drosophila. *Chromosoma*;117(1):25-39.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, accesado el 31/01/14.
- Ferraiuolo MA, Rousseau M, Miyamoto C, Shenker S, Wang XQ, Nadler M, Blanchette M, Dostie J.(2010). The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing. *Nucleic Acids Res.*; 38: 7472–7484.
- Flagiello D, Poupon MF, Cillo C, Dutrillaux B, Malfoy B. (1996). Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in small cell lung cancers. *FEBS Lett.* 12; 380(1-2):103-7.
- Flores-Luna L, Zamora Muñoz S, Salazar-Martínez E, Lazcano-Ponce E. (2000). Análisis de supervivencia. Aplicación en una muestra de mujeres con cáncer cervical en México. *Salud Pública Méx*; Vol. 42(3):242-251.
- Fraser J, Rousseau M, Shenker S, Ferraiuolo MA, Hayashizaki Y, Blanchette M, Dostie J. (2009).Chromatin conformation signatures of cellula differentiation. *Genome Biol.*; 10: R37.
- Gaarenstroom KN, Kenter GG, Bonfrer JM, Korse CM, Van de Vijver MJ, Fleuren GJ, Trimbos JB. (2000).Can initial serum cyfra 21-1, SCC antigen,

and TPA levels in squamous cell cervical cancer predict lymph node metastases or prognosis? *Gynecol Oncol.* Apr;77(1):164-70.

- Gaspar N, Marshall L, Perryman L, Bax DA, Little SE, Viana-Pereira M, Sharp SY, Vassal G, Pearson AD, Reis RM, Hargrave D, Workman P, Jones C. (2010). GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. Accesado el 29/mayo/2012.
- Gaspar N, Marshall L, Perryman L, Bax DA, Little SE, Viana-Pereira M, Sharp SY, Vassal G, Pearson AD, Reis RM, Hargrave D, Workman P, Jones C. (2010). MGMT-independent temozolomide resistance in pediatric glioblastoma cells associated with a PI3-kinase-mediated HOX/stem cell gene signature. *Cancer Res.* 15 70(22):9243-52.
- Ghoshal K, Motiwala T, Claus R, Yan P, Kutay H, Datta J, Majumder S, Bai S, Majumder A, Huang T, Plass C, Jacob ST. (2010). HOXB13, a target of DNMT3B, is methylated at an upstream CpG island, and functions as a tumor suppressor in primary colorectal tumors. *PLoS One.* Apr 29;5(4)
- Ghoshal K, Motiwala T, Claus R, Yan P, Kutay H, Datta J, Majumder S, Bai S, Majumder A, Huang T, Plass C, Jacob ST. (2010). HOXB13, a target of DNMT3B, is methylated at an upstream CpG island, and functions as a tumor suppressor in primary colorectal tumors. *PLoS One.* 2010 29;5(4):e10338.
- Gonzalez-Herrera A, Salgado-Bernabe M, Velazquez-Velazquez C, Salcedo-Vargas M, Andrade-Manzano A, Avila-Moreno F, Pina-Sanchez P.

- (2015). Increased expression of HOXB2 and HOXB13 proteins is associated with HPV infection and cervical cancer progression. *Asian Pac J Cancer Prev.*;16(4):1349-53
- Grau DJ, Chapman BA, Garlick JD, Borowsky M, Francis NJ, Kingston RE. (2011). Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge. *Genes Dev.*; 25: 2210–2221.
  - Green JA, Kirwan JM, Tierney JF. (2001). Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*; 358: 781-786.
  - Hanson RD, Hess JL, Yu BD, Ernst P, van Lohuizen M, Berns A, van der Lugt NM, Shashikant CS, Ruddle FH, Seto M, Korsmeyer SJ. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;96 (25):14372-7.
  - Hegi ME et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*; 352(10):997-1003.
  - Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, van Rietschoten JG, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Meijer CJ, Snijders PJ, Steenbergen RD. (2007). Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *Br J Cancer.*; 19; 97(10):1457-1464.
  - Hidalgo A, Baudis M, Petersen I, Arreola H, Piña P, Vázquez-Ortiz G, Hernández D, González J, Lazos M, López R, Pérez C, García J, Vázquez K, Alatorre B, Salcedo M.(2005).Microarray comparative genomic

hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC Cancer*; 9: 5-77.

- Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, Yamaguchi H, Akise D, Ueki M..(2003). Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci*; 94(5):437-441.
- Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, Harris AL, Stratford IJ, Price PM, West CM. (2004). Hypoxia-inducible factor 1alpha expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*. Dec 15;10(24):8405-12.
- Iida K, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri A, Yeasmin S, Otsuki Y, Kobayashi H, Nakayama S, Miyazaki K. (2011). EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *Br J Cancer*. Jul 26;105(3):420-7.
- Iliopoulos D, Oikonomou P, Messinis I, Tsezou A. (2009). Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. *Oncol Rep.*; 22(1):199-204.
- Illades-Aguilar B, Cortés-Malagón EM, Antonio-Véjar V, Zamudio-López N, Alarcón-Romero Ldel C, Fernández-Tilapa G, Hernández-Sotelo D, Terán-Porcayo MA, Flores-Alfaro E, Leyva-Vázquez MA. (2009). Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detect Prev.*; 32(4):300-7. Instituto Mexicano del Seguro

Social.Guía de referencia rápida. Diagnóstico y tratamiento de cáncer cérvico uterino.

- Inamura K, Togashi Y, Okui M, Ninomiya H, Hiramatsu M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Shimoji T, Noda T, Ishikawa Y.(2007). HOXB2 as a novel prognostic indicator for stage I lung adenocarcinomas J Thorac Oncol. 2(9):802-7.
- International Agency for Research on Cancer. (2009). IARC Monography: Anatomy of the cervix uteri. Consultado el 5-05-14.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyar S, Feinberg AP. (2009).The human colon cancer methylome shows similar hypo-and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. Nat Genet.; 41(2):178-86.
- Ishikawa H, Ohno T, Kato S, Wakatsuki M, Iwakawa M, Ohta T, Imai T, Mitsuhashi N, Noda SE, Nakano T, Tsujii H. (2006). Cyclooxygenase-2 impairs treatment effects of radiotherapy for cervical cancer by inhibition of radiation-induced apoptosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys.1;66(5):1347-55..
- Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, Nakajima M, Kitamoto Y, Saitoh J, Nakano T. (2004). Expression of hypoxic-inducible factor 1alpha predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. Oct 1;60(2):513-21.
- Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. (2004). Nat Rev Cancer; 4(12):988-993.

- Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, van Staveren IL, Klijn JG, Foekens JA, Berns EM. (2007). HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol.*25(6):662-8.
- Jerevall PL, Brommesson S, Strand C, Gruvberger-Saal S, Malmström P, Nordenskjöld B, Wingren S, Söderkvist P, Fernö M, Stål O.(2008). Exploring the two-gene ratio in breast cancer--independent roles for HOXB13 and IL17BR in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat.*107(2):225-34.
- Jones PA, Baylin SB. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*; 128(4):683-692.
- K.M. Prise, J.M. O'Sullivan. (2009).Radiation-induced bystander signaling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 9(5), 351–360
- Kan YY, Liou YL, Wang HJ, Chen CY, Sung LC, Chang CF, Liao CI. (2014). PAX1 methylation as a potential biomarker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer.* Jun;24(5):928-34.
- Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, Devidas M,
- Kim HJ, Wu HG, Park IA, Ha SW. (2003). High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*1;55(1):16-20.
- Kim TJ, Lee JW, Song SY, Choi JJ, Choi CH, Kim BG, Lee JH, Bae DS. (2006). Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Br J Cancer.* Jun 5;94(11):1678-82.
- Kim YB, Kim GE, Cho NH, Pyo HR, Shim SJ, Chang SK, Park HC, Suh CO, Park TK, Kim BS. (2002). Overexpression of cyclooxygenase-2 is

associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer*. 1;95(3):531-9.

- Kim YT, Park SW, Kim JW. (2002). Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. Oct;87(1):84-9.
- Kim V, Zaharieva I, Heublein S, Thangarajah F, Friese K, Mayr D, Jeschke U. (2014). ESR1 promoter methylation in squamous cell cervical cancer. *Anticancer Res*; 34(2):723-727.
- Kmita M, Fraudeau N, Héroult Y, Duboule D. (2002). Serial deletions and duplications suggest a mechanism for the collinearity of Hoxd genes in limbs. *Nature* 420, 145–150.
- Kron K, Liu L, Trudel D, Pethe V, Trachtenberg J, Fleshner N, Bapat B, van der Kwast T. (2012). Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 15;18(10):2896-904.
- Kron KJ, Liu L, Pethe VV, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, Ozcelik H, Fleshner NE, Briollais L, van der Kwast TH, Bapat B. (2010). DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression. *Lab Invest.*; 90(7):1060-7.
- Kron KJ, Liu L, Pethe VV, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, Ozcelik H, Fleshner NE, Briollais L, van der Kwast TH, Bapat B. (2010). DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression. *Lab Invest.*; 90(7):1060-7.

- Lai HC, Ou YC, Chen TC, Huang HJ, Cheng YM, Chen CH, Chu TY, Hsu ST, Liu CB, Hung YC, Wen KC, Yu MH, Wang KL. (2014). PAX1/SOX1 DNA methylation and cervical neoplasia detection: a Taiwanese Gynecologic Oncology Group (TGOG) study. *Cancer Med.* Aug;3(4):1062-74.
- Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL. (2006). HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J.*;75(1):23-31.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. (2001). Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer.* 1; 91(3):412-20.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. (2001).
- Lee EJ, et al. (2010). Distinct DNA methylation profiles between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of human uterine cervix. *Oncol Res*;18(9):401-408.
- Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Williams C, Young LS, Roberts S, Woodman CB. (2012). Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis.* 33(7):1286-93.
- Li H, et al. (2002). Expression of homeobox genes in cervical cancer. *Gin Onc* 84(2):216-221.

- Liao WT, Jiang D, Yuan J, Cui YM, Shi XW, Chen CM, Bian XW, Deng YJ, Ding YQ. (2011). HOXB7 as a prognostic factor and mediator of colorectal cancer progression. *Clin Cancer Res.* 1;17(11):3569-78.
- Liloglou T, et al . (2012). Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Can Lett, en prensa.*
- Litovkin K, Joniau S, Lerut E, Laenen A, Gevaert O, Spahn M, Kneitz B, Isebaert S, Haustermans K, Beullens M, Van Eynde A, Bollen M. (2014). Methylation of PITX2, HOXD3, RASSF1 and TDRD1 predicts biochemical recurrence in high-risk prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.;* 140(11):1849-61.
- Liu CY, Chao TK, Su PH, Lee HY, Shih YL, Su HY, Chu TY, Yu MH, Lin YW, Lai HC. (2009). Characterization of LMX-1A as a metastasis suppressor in cervical cancer. *J Pathol,* 219(2):222-31.
- Liu L, Kron KJ, Pethe VV, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, Ozcelik H, Fleshner NE, Briollais L, van der Kwast TH, Bapat B. (2011). Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGF $\beta$ 2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *Int J Cancer.*15; 129(10):2454-62.
- Liu Z, Ren G, Shangguan C, Guo L, Dong Z, Li Y, Zhang W, Zhao L, Hou P, Zhang Y, Wang X, Lu J, Huang B. (2012). ATRA inhibits the proliferation of DU145 prostate cancer cells through reducing the methylation level of HOXB13 gene. *PLoS One;* 7(7):e40943.

- López R, Garrido E, Piña P, Hidalgo A, Lazos M, Ochoa R, Salcedo M. (2006). HOXB homeobox gene expression in cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*.; 16(1):329-35.
- López R, Garrido E, Vázquez G, Piña P, Pérez C, Alvarado I, Salcedo M. (2006). A subgroup of HOX Abd-B gene is differentially expressed in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*;16(3):1289-96.
- López-Saavedra A., Lizano-Soberón M. (2002). Cáncer cérvico uterino y el Virus del Papiloma Humano: la historia que nunca termina. *Rev Ins.Nac.Can.*
- M.W. Dewhirst, Y. Cao, B. Moeller. (2008).Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 8(6), 425–437
- Ma D, Jiang C, Hu X, Li Q, Li T, Yang Y, Li O. (2011). Methylation patterns of the IFN- $\gamma$  gene in cervical cancer tissues. *Sci Rep*; 11; 4:6331.
- Mahapatra S,et al .(2012). Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Can Res* 18(10):2882-2895.
- Makiyama K, Hamada J, Takada M, Murakawa K, Takahashi Y, Tada M, Tamoto E, Shindo G, Matsunaga A, Teramoto K, Komuro K, Kondo S, Katoh H, Koike T, Moriuchi T. (2005).Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep*. 13(4):673-9.
- Mallo M,et al . (2010). HOX genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol* 344(1):7-15.
- Mani E, Medina LA, Isaac-Olivé K, Dueñas-González A. (2014) Radiosensitization of cervical cancer cells with epigenetic drugs hydralazine and valproate. *Eur J Gynaecol Oncol*.; 35(2):140-142.

- Marcinkiewicz KM, Gudas LJ. (2014). Altered histone mark deposition and DNA methylation at homeobox genes in human oral squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol.*; 229(10):1405-16.
- Marzese DM, Scolyer RA, Huynh JL, Huang SK, Hirose H, Chong KK, Kiyohara E, Wang J, Kawas NP, Donovan NC, Hata K, Wilmott JS, Murali R, Buckland ME, Shivalingam B, Thompson JF, Morton DL, Kelly DF, Hoon DS. (2013). Epigenome-wide DNA methylation landscape of melanoma progression to brain metastasis reveals aberrations on homeobox D cluster associated with prognosis. *Hum Mol Genet.* 1;23(1):226-238.
- Marzese DM, Scolyer RA, Huynh JL, Huang SK, Hirose H, Chong KK, Kiyohara E, Wang J, Kawas NP, Donovan NC, Hata K, Wilmott JS, Murali R, Buckland ME, Shivalingam B, Thompson JF, Morton DL, Kelly DF, Hoon DS. (2014). Epigenome-wide DNA methylation landscape of melanoma progression to brain metastasis reveals aberrations on homeobox D cluster associated with prognosis. *Hum Mol Genet.* 1;23(1):226-38.
- McCabe CD, Spyropoulos DD, Martin D, Moreno CS. (2008). Genome-wide analysis of the homeobox C6 transcriptional network in prostate cancer. *Cancer Res*; 15; 68(6):1988-96
- McIlroy M, Early S, O Gaora P, Pennington S, Hill AD, Young LS. (2010). Interaction of developmental transcription factor HOXC11 with steroid receptor coactivator SRC-1 mediates resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Cancer Res.*; 70(4):1585-1594.

- Michimata R, Watari H, Tomaru U, Sakuragi N, Ishizu A. (2013). Human papillomavirus 16-positive uterine cervical squamous cell carcinoma with coinfection with human papillomavirus 34 has a lower incidence in lymph node metastasis than that without coinfection with human papillomavirus 34. *Pathobiology.*; 80(5):259-64.
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell.* 10(5):1107-17.
- Min J, Zhang Y, Xu RM. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev.* 17: 1823–1828.
- Moens C, Selleri L. (2006). HOX cofactors in vertebrate development. *Dev Biol*; 291: 193 – 206.
- Montalvo-Esquivel, G Coronel Martínez, JA, Alvarado Zermeño A, Cantú de León DF, Flores Alatraste D, Ortega Rojo A, González Enciso A, Isla Ortiz D, Muñoz González DE, Robles Flores JU, Solorza Luna G, Mota García A, Gallardo Rincón D, Morales Vázquez F, Cetina Pérez LM y Herrera Gómez A.(2011). Oncoguía: Cáncer-cervico uterino. *Rev Ins.Nac.Can.*
- Montavon T, Le Garrec J-F, Kerszberg M, Duboule D. (2008). Modeling Hox gene regulation in digits: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes Dev.* 22, 346–359.

- Mulero-Navarro S, Esteller M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol*; 68(1):1-11.
- Muller J et al. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197–208.
- Mullighan CG, Wang X, Murphy M, Ar K, Wharton W, Borowitz MJ, Bowman WP, Bhojwani D, Carroll WL, Camitta BM, Reaman GH, Smith MA, Downing JR, Hunger SP, Willman CL. (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Feb 18; 115(7):1394-405.
- Murat A, et al. (2008). Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* : 3015-3024.
- Muthusamy V, Duraisamy S, Bradbury CM, Hobbs C, Curley DP, Nelson B, Bosenberg M. (2006). Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer Res*. 1;66(23):11187-93.
- Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. (1997). Correlation of cervical carcinoma c-erb B-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. Feb 1;79(3):513-20.
- Narayan G, et al. (2010) Integrative genomic approaches in cervical cancer: implications for molecular pathogenesis. *Future Oncol.* ; 6(10):1643-1652.

- National Comprehensive Cancer Network. (2013). Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): Cervical cancer. Consultado el 5-04-2013.
- Ng QS, Goh V, Milner J, Stratford MR, Folkes LK, Tozer GM, Saunders MI, Hoskin PJ. (2007). Effect of nitric-oxide synthesis on tumour blood volume and vascular activity: a phase I study. *Lancet Oncol.* Feb;8(2):111-8.
- Noordermeer D, Leleu M, Splinter E, Rougemont J, De Laat W, Duboule D. (2011). The dynamic architecture of Hox gene clusters. *Science* 334,222–225.
- Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, Pras E, Maduro JH, Reyners AK, de Bock GH, Wisman GB, Schuurin E, van der Zee AG. (2009). Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo) radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res.* Dec 1;15(23):7389-97.
- Norris JD, Chang CY, Wittmann BM, Kunder RS, Cui H, Fan D, Joseph JD, McDonnell DP. (2009). The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens. *Mol Cell.* 13; 36(3):405-16.
- Novak P, et al. (2006). Epigenetic inactivation of the HOXA gene cluster in breast cancer. *Cancer Res* 66(22):10664-10670.
- Ohara K, Tanaka Y, Tsunoda H, Nishida M, Sugahara S, Itai Y. (2002). Assessment of cervical cancer radioresponse by serum squamous cell carcinoma antigen and magnetic resonance imaging. *Obstet Gynecol.* Oct;100(4):781-7.

- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet.*; 39(2):237-42.
- Okuda H, Toyota M, Ishida W, Furihata M, Tsuchiya M, Kamada M, Tokino T, Shuin T. (2006). Epigenetic inactivation of the candidate tumor suppressor gene HOXB13 in human renal cell carcinoma. *Oncogene.* 16;25(12):1733-42.
- Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, Gobeil S, Green MR. (2009). Epigenetic silencing of the RASSF1A tumor suppressor gene through HOXB3-mediated induction of DNMT3B expression. *Mol Cell.*23;36(2):219-30
- Pattatucci AM, Kaufman TC. (1991).The homeotic gene Sex combs reduced of *Drosophila melanogaster* is differentially regulated in the embryonic and imaginal stages of development. *Genetics.* 129(2):443-461.
- Paulíková S, Chmelařová M, Petera J, Palička V, Paulík A. (2013). Hypermethylation of RAD51L3 and XRCC2 genes to predict late toxicity in chemo radiotherapy-treated cervical cancer patients. *Folia Biol (Praha);* 59(6):240-245.
- Pearcey R, Miao Q, Kong W, Zhang-Salomons J, Mackillop WJ. *J Clin Oncol.* (2007). Impact of adoption of chemoradiotherapy on the outcome of cervical cancer in Ontario: results of a population-based cohort study. 10; 25(17):2383-8.

- Perovic MV, Berisavac MJ, Kuljic-Kapulica N, Jovanovic T. (2003). High-risk human papillomavirus (HPV) types in patients with squamous intraepithelial lesions (SIL). *Eur J Gynaecol Oncol.*; 24(2):178-80.
- Pilato B, Pinto R, De Summa S, Lambo R, Paradiso A, Tommasi S. (2013). HOX gene methylation status analysis in patients with hereditary breast cancer. *J Hum Genet.*;58(1):51-3.
- Piña SP, Hernández DM, López RR, Vázquez OG, Péres PC, Lizano SM, González SJ, Cruz TF y Salcedo VM. (2006). Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer*, 16:1-7.
- Raval A, Tanner SM, Byrd JC, Angerman EB, Perko JD, Chen SS, Hackanson B, Grever MR, Lucas DM, Matkovic JJ, Lin TS, Kipps TJ, Murray F, Weisenburger D, Sanger W, Lynch J, Watson P, Jansen M, Yoshinaga Y, Rosenquist R, de Jong PJ, Coggill P, Beck S, Lynch H, de la Chapelle A, Plass C. (2007). Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*. 1;129(5):879-90.
- Recillas-Targa F, Escamilla del Arenal M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*, Vol
- Restifo LL, Merrill VK. (1994). Two *Drosophila* regulatory genes, deformed and the Broad-Complex, share common functions in development of adult CNS, head, and salivary glands. *Dev Biol*; 162 (2):465-485.
- Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oudejans CB, Jiwa NM, Walboomers JM, Meijer CJ. (1994). Expression of the homeobox

gene HOXC4 in keratinocytes of normal skin and epithelial skin tumors is correlated with differentiation. *J Invest Dermatol*; 103(3):341-346.

- Ries LAG, Harkins D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Eisner MP, Horner MJ, Howlader N, Hayat M, Hankey BF, Edwards BK (eds).(2006). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003, National Cancer Institute.
- Roman A, Munger K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*; 445(1-2):138-68.
- Rose PG, et al. (2007). Gynecologic Oncology Group. Long-term follow-up of a randomized trial comparing concurrent single agent cisplatin, cisplatin-based combination chemotherapy, or hydroxyurea during pelvic irradiation for locally advanced cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1; 25(19):2804-2810.
- Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. (2001) Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis.* 15; 184(12):1508-17.
- Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, Pandita RK, Sharma GG, Ha HC, Gasson J, Hanakahi LA, Pandita TK, Sukumar S. (2007). A role for the HOXB7 homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res.*67(4):1527-35.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell* 25, 15–30.

- Salsi V, Zappavigna V. (2006). Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. *J Biol Chem.*, 27; 281(4):1992-1999.
- Salsi V, Zappavigna V. (2006). Hoxd13 and Hoxa13 directly control the expression of the EphA7 Ephrin tyrosine kinase receptor in developing limbs. *J Biol Chem.*, 27; 281(4):1992-1999.
- Schadt EE, Edwards SW, GuhaThakurta D, Holder D, Ying L, Svetnik V, Leonardson A, Hart KW, Russell A, Li G, Cavet G, Castle J, McDonagh P, Kan Z, Chen R, Kasarskis A, Margarint M, Caceres RM, Johnson JM, Armour CD, Garrett-Engle PW, Tsinoemas NF, Shoemaker DD. (2004). A comprehensive transcript index of the human genome generated using microarrays and computational approaches. *Genome Biol* 5(10):R73.
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet.*; 39(2):232-6.
- Sebova K, et al (2011). RASSF1A and CDH1 hypermethylation as potential epimarkers in breast cancer. *Cancer biom* 10(1):13-26.
- Seo HC, Edvardsen RB, Maeland AD, Bjordal M, Jensen MF, Hansen A, Flaatt M, Weissenbach J, Lehrach H, Wincker P, Reinhardt R, Chourrout D. (2004). Hox cluster disintegration with persistent anteroposterior order of expression in *Oikopleura dioica*. *Nature.*; 431(7004):67-71.
- Shah N, Sukumar S. (2010). The HOX genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer*. 10(5):361-371.

- Shim C, et al. (1998). Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res*
- Shinawi T, Hill VK, Krex D, Schackert G, Gentle D, Morris MR, Wei W, Cruickshank G, Maher ER, Latif F. (2013). DNA methylation profiles of long- and short-term glioblastoma survivors. *Epigenetics*; 8(2):149-56.
- Soonthornthum T, Arias-Pulido H, Joste N, Lomo L, Muller C, Rutledge T, Verschraegen C. (2011). Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. *Ann Oncol*. Oct;22(10):2166-78.
- Takeda M, Sakuragi N, Okamoto K, Todo Y, Minobe S, Nomura E, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Fujimoto S. (2002). Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand*. May;81(5):451-7.
- Tang B, Qu Y, Zhao F, Mao M, Tang J, Li X, Ferriero D, Mu D. (2009). In vitro effects of hypoxia-inducible factor 1alpha on the biological characteristics of the SiHa uterine cervix cancer cell line. *Int J Gynecol Cancer*. Jul;19(5):898-904.
- Tian X, Chen D, Zhang R, Zhou J, Peng X, Yang X, Zhang X, Zheng Z. (2015). Quantitative survey of multiple CpGs from 5 genes identifies CpG methylation panel discriminating between high- and low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Epigenetics*. 22;7(1):4.
- Tomioka N, Morita K, Kobayashi N, Tada M, Itoh T, Saitoh S, Kondo M, Takahashi N, Kataoka A, Nakanishi K, Takahashi M, Kamiyama T, Ozaki

- M, Hirano T, Todo S. (2010). Array comparative genomic hybridization analysis revealed four genomic prognostic biomarkers for primary gastric cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 201(1):6-14.
- Vasiljević N, Scibior-Bentkowska D, Brentnall AR, Cuzick J, Lorincz AT. (2014). Credentialing of DNA methylation assays for human genes as diagnostic biomarkers of cervical intraepithelial neoplasia in high-risk HPV positive women. *Gynecol Oncol.* Mar;132(3):709-14.
  - Verhoef VM, Bosgraaf RP, van Kemenade FJ, Rozendaal L, Heideman DA, Hesselink AT, Bekkers RL, Steenbergen RD, Massuger LF, Melchers WJ, Bulten J, Overbeek LI, Berkhof J, Snijders PJ, Meijer CJ. (2014). Triage by methylation-marker testing versus cytology in women who test HPV-positive on self-collected cervicovaginal specimens (PROTECT-3): a randomised controlled non-inferiority trial. *Lancet Oncol.* ;15(3):315-22.
  - Víctor Manuel Vargas-Hernández\*, Gustavo Acosta-Altamirano, Víctor Manuel Vargas- Aguilar, Mario Adán Moreno-Eutimiob y Agustín Isodoro Rodríguez-Blazc (2014). Imagenología en la estadificación y recurrencia del cáncer cervicouterino. *Gaceta Mexicana de Oncología.*; 13(3):172-182
  - Wang F, Yang Y, Fu Z, Xu N, Chen F, Yin H, Lu X, Shen R, Lu C. (2014). Differential DNA methylation status between breast carcinomatous and normal tissues. *Biomed Pharmacother.* 2014 Jul; 68(6):699-707. *Biomed Pharmacother.*; 68(6):699-707.
  - Wang L, Chen S, Xue M, Zhong J, Wang X, Gan L, Lam EK, Liu X, Zhang J, Zhou T, Yu J, Jin H, Si J. (2012). Homeobox D10 gene, a candidate tumor

suppressor, is downregulated through promoter hypermethylation and associated with gastric carcinogenesis. *Mol Med.* 9; 18:389-400.

- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.*; 39(4):457-466.
- Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet.*; 39(2):157-8.
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C,
- Xavier FC, Destro MF, Duarte CM, Nunes FD. (2014) Epigenetic repression of HOXB cluster in oral cancer cell lines. *Arch Oral Biol.*;59(8):783-9.
- Xavier FC, Destro MF, Duarte CM, Nunes FD. (2014).Epigenetic repression of HOXB cluster in oral cancer cell lines. *Arch Oral Biol.* 59(8):783-9.
- Xia S, Zhao Y, Yu S, Zhang M. (2010). Activated PI3K/Akt/COX-2 pathway induces resistance to radiation in human cervical cancer HeLa cells. *Cancer Biother Radiopharm.* Jun; 25(3):317-23.
- Yuan W, Zhang X, Xu Y, Li S, Hu Y, Wu S.(2014). Role of HOXB7 in regulation of progression and metastasis of human lung adenocarcinoma. *Mol Carcinog.*53(1):49-57.
- Zhang Q, Jin J, Tao Q. (2007). Aberrant methylation of tumor suppressor genes in renal cell carcinoma. *Ai Zheng*; 26(11):1276-80. Review.
- Zhang X, Zheng Z, Yingji S, Kim H, Jin R, Renshu L, Lee DY, Roh MR, Yang S. (2014). Downregulation of glutathione peroxidase 3 is associated

with lymph node metastasis and prognosis in cervical cancer. *Oncol Rep.*;  
31(6):2587-92.