



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El perfil de metilación global distingue distintos desenlaces en pacientes con
cáncer cervical.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Carlos Manuel Contreras Romero

Alejandro Zentella Dehesa

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran

Lorena Aguilar Arnal

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Carlos Pérez Plasencia

Instituto Nacional de Cancerología

Ciudad de México, Octubre, 2019



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.

CONTENIDO

Introducción.....	5
El cáncer de cérvix	6
Características del cáncer de cérvix.....	8
VPH y la etiología del cáncer de cérvix	9
Detección y diagnóstico.....	11
Estadios del CC y esquema terapéutico.....	12
Etapas Localmente Avanzadas.....	13
MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER.....	14
La metilación como un biomarcador	18
Hipótesis	20
Objetivos.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Muestras de tejido.....	21
Microarreglo y análisis.....	23
Selección de genes candidatos	25
Diseño de Oligonucleótidos	27
Extracción de dna GENÓMICO.....	29
Conversión por Bisulfito.....	30
Ensayo de MSP (Methylation Specific-PCR).....	30
Expresión Relativa de los Genes (qPCR).....	32
Resultados.....	35
Análisis global del estado de metilación.....	35
El nivel de metilación es distintivo en pacientes que respondieron y en pacientes que no respondieron al tratamiento.	40
La expresión de los genes BRD9, CTU1 y DOCK8 esta relacionada con el nivel de metilación de su región promotora	46

Discusión.....	48
Conclusiones	51
Referencias	52

Índice de Figuras

1. Mortalidad e incidencia del cáncer de Cérvix. --- 6
2. Cáncer de cérvix y desarrollo humano. --- 7
3. Anatomía del Cérvix. --- 8
4. Genoma del VPH. --- 10
5. Papanicolaou. --- 11
6. Estadificación clínica del cáncer de cérvix. --- 12
7. Metilación de citosinas. --- 16
8. Proteínas de unión a grupo metilo. --- 17
9. aPRIMES. --- 24
10. Localización de la región promotora. --- 26
11. Densidad CpG. --- 27
12. Parámetros de Oligonucleótidos. --- 28
13. Extracción de ácidos nucleicos. --- 30
14. Oligonucleótidos para qPCR. --- 34
15. Mapa de calor. --- 36
16. Densidad CpG BRD9. --- 37
17. Densidad CPG CTU1. --- 38
18. Densidad CpG DOCK8. --- 39
19. B-Values. --- 40
20. Conversión por bisulfito. --- 41
21. Criterio de validación de MSP. --- 42
22. MSP BRD9. --- 43
23. MSP CTU1. --- 44
24. MSP DOCK8. --- 44
25. Expresión relativa del gen BRD9. --- 46
26. Expresión relativa del gen CTU1. --- 47
27. Expresión relativa del gen DOCK8. --- 47

Índice de Tablas

1. **Parámetros Clinicopatológicos Descubrimiento. --- 22**
2. **Parámetros Clinicopatológicos Validación. --- 23**
3. **Oligonucleótidos. --- 28**
4. **Características de Oligonucleótidos. --- 31**
5. **Genes Candidatos. --- 36**
6. **Porcentaje de metilación en pacientes. --- 45**

Tabla de abreviaciones

1. **Organización Mundial de la Salud (OMS).**
2. **Cáncer de Cérvix (CC).**
3. **Índice de Desarrollo Humano (HDI).**
4. **Virus de Papiloma Humano (VPH).**
5. **Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (LSIL).**
6. **Lesiones Intraepiteliales de Alto Grado (HSIL).**
7. **Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).**
8. **Histona Metil-Transferasa (HMTS).**
9. **Histona Acetil-Transferasa (HATS).**
10. **5 Metil-citosina (5Mc).**
11. **5 Hidroximetil-citosina (5Hmc).**
12. **Diez Once Translocadoras Metilcitosina Deshidrogenasa (TET).**
13. **Proteínas de Unión a grupos Metilo (MBP).**
14. **Respuesta (R).**
15. **No Respuesta (NR).**
16. **Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST).**
17. **DNA Complementario (cDNA).**
18. **Cytosolic Thiouridylase Subunit 1 (CTU1).**
19. **Bromodomain Containing 9 (BRD9).**
20. **Dedicator Of Cytokinesis 8 (DOCK8).**
21. **Methylation Specific-PCR (MSP)**
22. **Metilado (M).**
23. **No metilado (U).**
24. **Hemimetilado (HM).**

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un término amplio utilizado en medicina para describir un conjunto de enfermedades causadas por la proliferación descontrolada de células y su propagación, tanto a tejidos adyacentes como a órganos distales. Estas células ya no cumplen la función tisular específica y solo forman conglomerados celulares conocidos tumores sólidos (Roy & Saikia, 2016). De acuerdo a las estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). El cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedades no transmisibles antes de los 70 años en 91 de 172 países (Bray et al., 2018a).

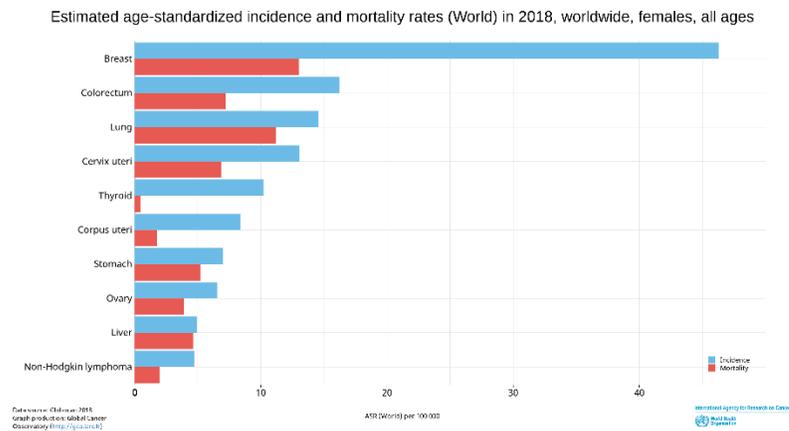
El cáncer, desde una perspectiva biológica se le puede definir como una serie de alteraciones celulares multifacéticas que conllevan a la obtención de características distintivas de una célula tumoral (Hassanpour & Dehghani, 2017). Estas características van desde la evasión de sistema inmune, inestabilidad genómica, potencial replicativo ilimitado hasta la invasión a tejidos distales conocido como metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

En la población de varones a nivel mundial, los tipos de cáncer más comunes son pulmón, próstata, cáncer de estómago y colorrectal, siendo el pulmonar el que mayor índice de mortalidad tiene. En la población femenina a nivel mundial, los tipos de cáncer mas comunes son el cáncer de mama, colorrectal, pulmón y el cáncer de cérvix. En mujeres el cáncer de mama es el que mayor cifra de incidencia presenta, pero las muertes por cáncer de mama son menos un tercio de esta cifra, teniendo en cuenta esto, el cáncer de pulmón y el cáncer de cérvix son los dos tipos que su cifra de mortalidad representa más del 50% de su incidencia (Bray et al., 2018a) (Figura 1A).

EL CÁNCER DE CÉRVIX

El cáncer de cérvix (CC) o cáncer cervicouterino ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en cuanto a incidencia y mortalidad con respecto a muertes por cáncer en mujeres (Figura 1 A).

A)



B)

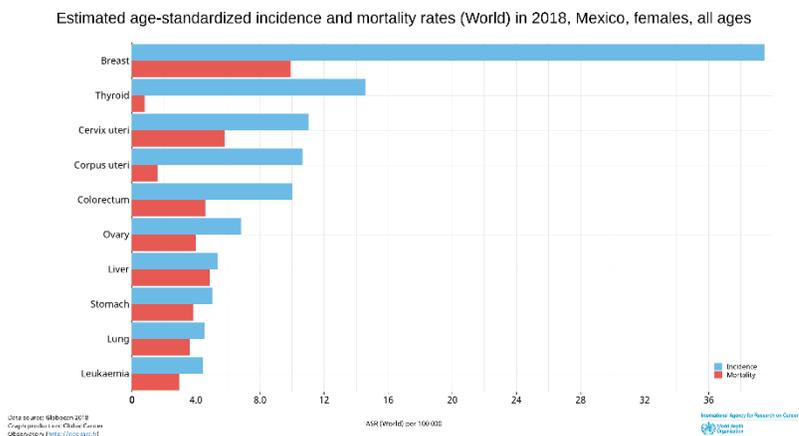


Figura 1. Mortalidad e incidencia del cáncer de Cérvix. Imágenes obtenidas de la página IARC, Global Cancer Observatory, A) Grafica de incidencia y mortalidad a nivel mundial, se observa que el cáncer de Cérvix se posiciona en cuarto lugar en ambos indicadores. B) Grafica de incidencia y mortalidad en México, en nuestro país representa el tercer lugar en cuanto a incidencia y segundo en cuanto a mortalidad en la población femenina.

Tan solo en mujeres mexicanas, ese lugar asciende al tercero en cuanto a incidencia y segundo en cuanto a mortalidad, desplazando al cáncer de pulmón, la leucemia y el cáncer de ovario (Figura 1 B) (Bray et al., 2018b) .

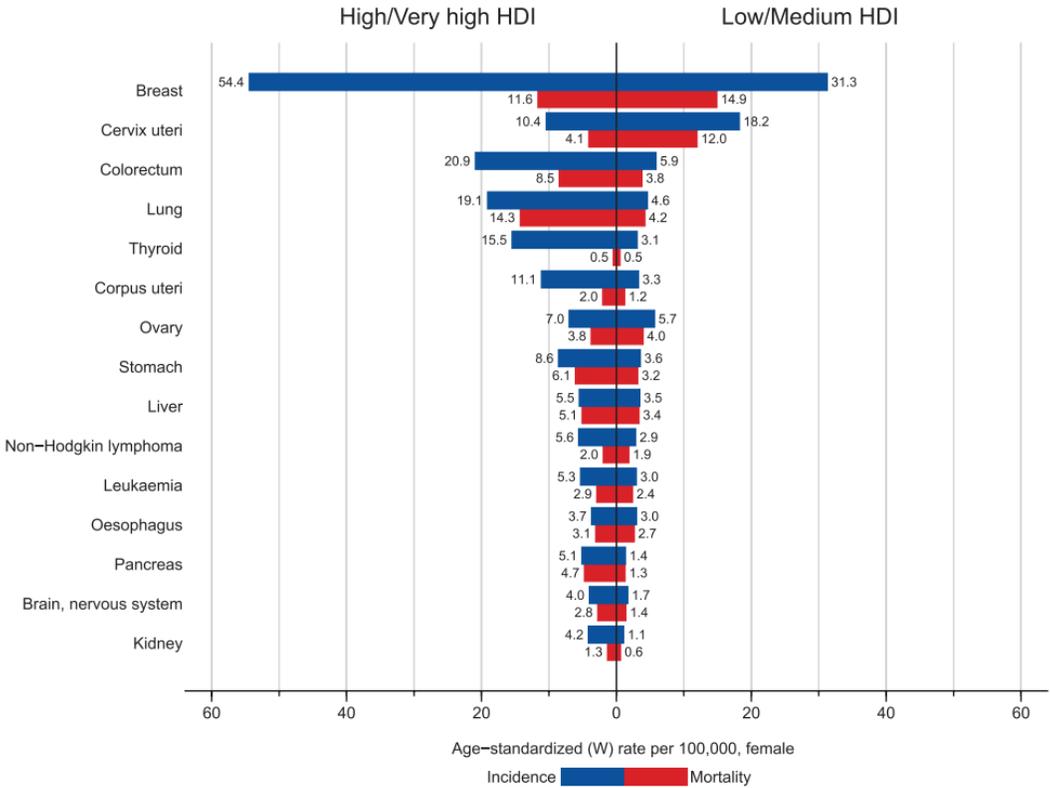


Figura 2. Cáncer de Cérnix y desarrollo humano. Grafica donde muestran los distintos tipos de cáncer (Incidencia y Mortalidad) de acuerdo al índice de desarrollo humano.

Este tipo de cáncer es más común en países con un índice de desarrollo humano (HDI) bajo o medio y disminuye en aquellos países en los cuales el HDI es alto o muy alto, incluso la mortalidad disminuye a menos del 50% en este tipo de países (Figura 2) (Bray et al., 2018b).

CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER DE CÉRVIX

Se define como CC a cualquier neoplasia que se origine en las zonas del cuello uterino y cérvix, los dos principales tipos celulares que cubren el cuello uterino son; las células escamosas en el ectocérvix y las células glandulares en el endocérvix (López Saavedra & Lizano Soberón, 2006). El punto en el que estos dos tipos celulares convergen se denomina Zona de transición o Zona de transformación (Figura 3), el 90% de los tumores de cérvix surgen del epitelio escamoso metaplásico de dicha zona, el otro 10% son adenocarcinomas que derivan del epitelio del endocérvix (Carreras Collado, Xercavins Montosa, & Checa Vizca.no, 2007).

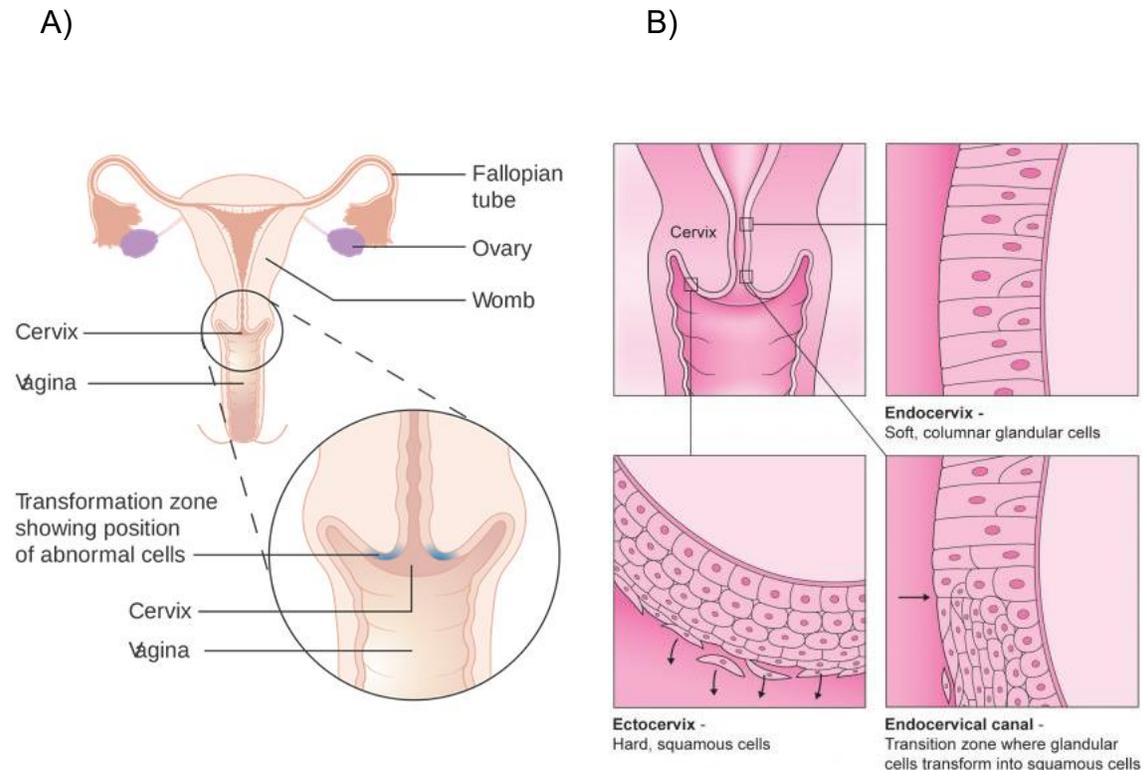


Figura 3. Anatomía del Cérvix. A) Esquema general del aparato reproductivo femenino indicando en un círculo la zona correspondiente al cérvix. B) Ampliación de la zona concerniente al cérvix donde podemos visualizar los dos epitelios que lo conforman, columnar glandular y escamoso estratificado, también se observa la zona de transición en la cual convergen estos dos tipos epiteliales.

VPH Y LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE CÉRVIX

En el contexto del cáncer, los factores de riesgo son aquellos que incrementan la incidencia de esta enfermedad en la población. En cada tipo de cáncer puede existir un factor de riesgo característico, como en algunos casos la raza, o las características hereditarias, algunos otros son factores compartidos por diversos tipos de cáncer, como, por ejemplo, factores relacionados con el ambiente y los hábitos, como fumar, la ingesta excesiva de bebidas alcohólicas, una dieta desequilibrada, etc (Carlson et al., 2009).

Múltiples estudios han puesto de manifiesto la relación que existe entre el Virus de Papiloma Humano (VPH) y el CC lo cual fue demostrado por el doctor Harald zur Hausen, quien corroboró que tejidos de cáncer de cérvix contenían material genético de VPH (zur Hausen, 1999). Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el 99.8% de los casos reportados de cáncer de cérvix están asociados a infección por VPH. (International Agency for Research on Cancer., 2007)

El genoma del VPH tiene un tamaño de 8kb en el que se encuentran codificadas proteínas funcionales como elicasas (E1), proteínas reguladoras de transcripción (E2), proteínas que evitan la apoptosis posterior a daño a DNA (E5) y dos oncoproteínas (E6 y E7) que abaten la expresión de dos importantes genes supresores de tumor, Retinoblastoma 1 (Rb1) y Tumor Protein 53 (p53), lo que puede desencadenar la tumorigénesis.

E7 es una proteína de aproximadamente 13kDa que interactúa con miembros de la familia de proteínas pRb (p105, p107 y p130) uniéndose a ellas con una alta afinidad e induciendo su degradación vía proteosoma (Boyer, Wazer, & Band, 1996). Las proteínas de la familia pRb son reguladores críticos del ciclo celular secuestrando factores de transcripción de la familia E2F involucrados directamente con la progresión de ciclo celular (Yeo-Teh, Ito, & Jha, 2018).

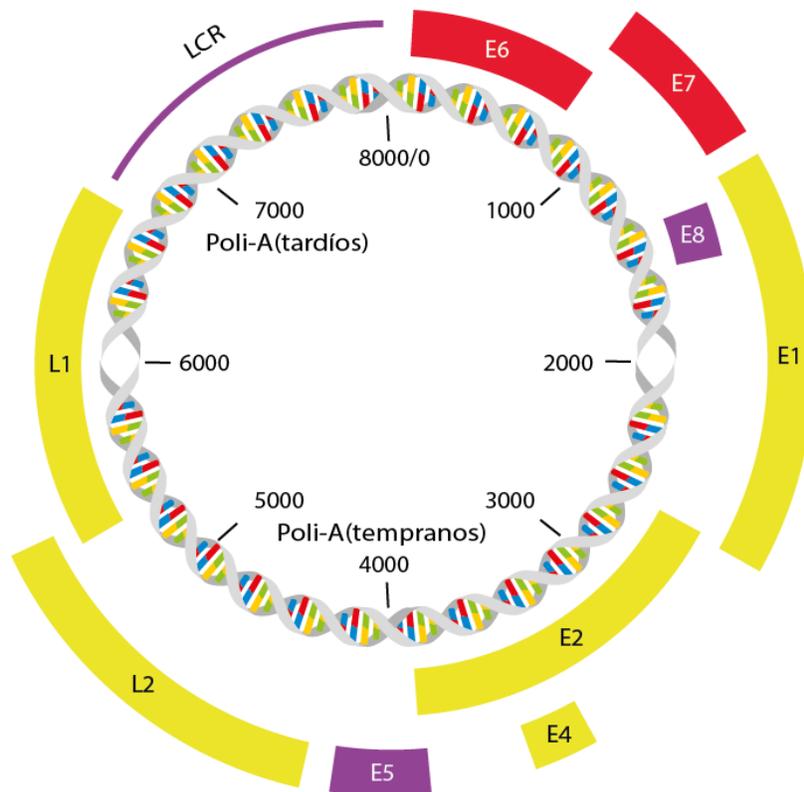


Figura 4 Genoma del VPH. Podemos observar una esquematización del genoma de Virus del Papiloma Humano, su genoma mide aproximadamente 8kb, podemos observar la ubicación en la que se encuentran codificadas las diferentes proteínas, tanto estructurales como L1 Y L2 hasta las dos oncoproteínas E6 y E7.

E6, por su parte es una proteína que cuenta con 150 aminoácidos y pesa aproximadamente 18KDa. Esta proteína se interactúa con p53 impidiendo así su actividad y posteriormente siendo degradado por vía proteosoma (Mantovani & Banks, 2001), además se ha visto también que E6 puede retener a p53 en el citoplasma, evitando su translocación al núcleo impidiendo así su función como factor de transcripción (zur Hausen, 1999).

El 75% de los casos de infección por VPH en mujeres son transitorias, solo un 25% progresará a lesiones intraepiteliales de bajo grado (LSIL). De las pacientes que progresan a LSIL solo el 20 o 30% progresarán, a su vez, a lesiones intraepiteliales de alto grado (HSIL), esto quiere decir que, del total de las mujeres infectadas por algún tipo de VPH, el 90% no mostrara evidencia del tipo viral adquirido después de un mínimo de 14 meses (López Saavedra & Lizano Soberón, 2006) (Hildesheim et

al., 1994). Con esta evidencia podemos decir que el VPH es un factor necesario, pero no suficiente para desarrollar la carcinogénesis de cérvix.

DETECCIÓN Y DIAGNOSTICO

Los principales métodos para el diagnóstico de este tipo de neoplasias son estudios citológicos como el Papanicolaou (Figura 5.), que consiste en recolectar células del cuello uterino para detectar algún cambio en la zona de transición (López Saavedra & Lizano Soberón, 2006).

Este tipo de procedimiento citológico ayuda a incrementar la detección de cáncer invasivo en etapa temprana para abordar un esquema terapéutico adecuado y a la detección y tratamiento de lesiones pre-invasivas antes de que dichas lesiones progresen a un grado mayor, además de apoyarse en estudios basados en diagnóstico por medio de biopsias llamados estudios histopatológicos (Saslow et al., 2012).

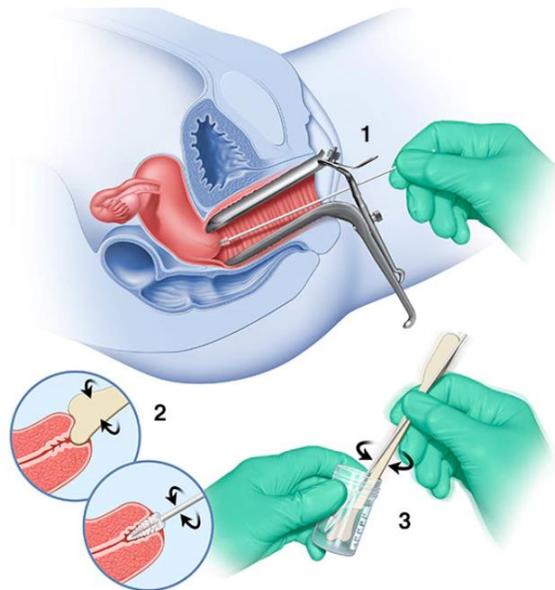


Figura 5. Papanicolaou. 1) Espejo colocado para permitir la exploración del Cérvix. 2) Con la espátula se toma una muestra de mucosa. 3) Con el cepillo se toma una muestra de células mediante un movimiento giratorio. Posterior a la toma de muestra, se envían los elementos para que sean examinados en patología.

ESTADIOS DEL CC Y ESQUEMA TERAPÉUTICO

La estadificación para este tipo de carcinoma basándose en exámenes clínicos, histopatológicos y pruebas citológicas, es la última modificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) 2009 (Figura 6), la cual divide los diferentes estadios basándose en características como; tamaño del tumor, compromiso vaginal y parametrial determinando los estadios en fases tempranas (0 - IIA), localmente avanzadas (IIA - IV) y avanzadas (IVA - IVB). La estadificación quirúrgica de la enfermedad local es buena en la etapa temprana, ya que un esquema quirúrgico o de ablación es el tratamiento más adecuado en este caso. Por el contrario, la evaluación del tamaño y los parámetros son difíciles en la enfermedad localmente avanzada y en etapa avanzada (Pecorelli, Zigliani, & Odicino, 2009).

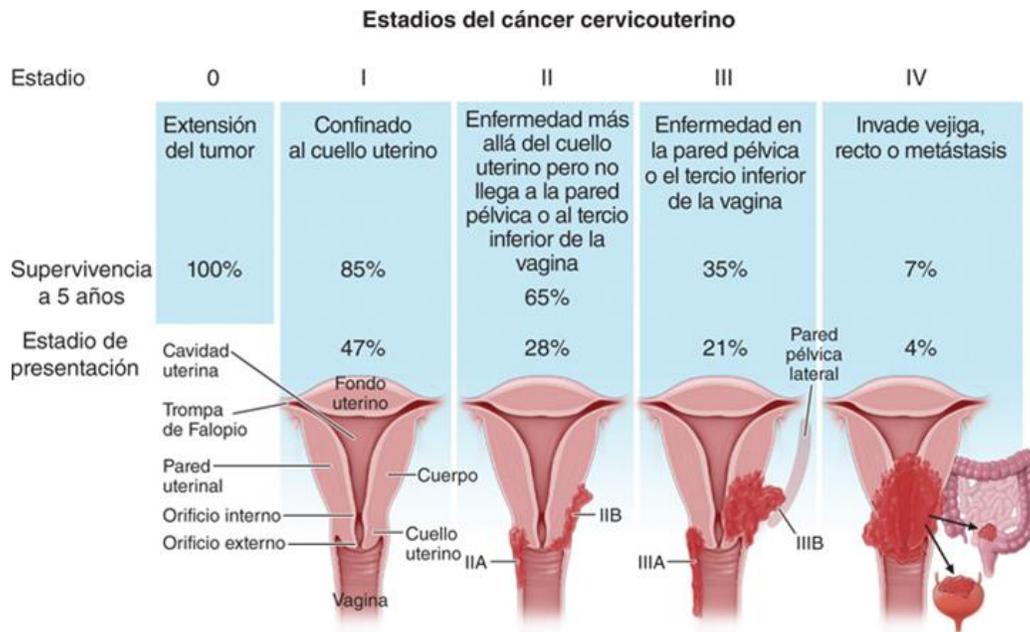


Figura 6. Estadificación clínica del Cáncer de cérvix, la tabla muestra los estadios en los que la enfermedad progresa, ubicación de la lesión y confinamiento o diseminación a otros tejidos, imagen tomada de (Fauci, Harrison, & Harrison, 2009)

La detección temprana es la mejor alternativa para evitar la progresión de cualquier neoplasia, sin embargo, las opciones terapéuticas son decididas de acuerdo al estadio en el que se encuentre la paciente.

Para etapas tempranas (I-IBI) el procedimiento es preferentemente quirúrgico por el tamaño de la lesión, puede ir desde una cervicectomía con conización cervical, hasta una histerectomía radical tipo III la cual tiene una efectividad de respuesta de hasta el 92% (DiSaia, Creasman, Mannel, McMeekin, & Mutch, 2018).

El tratamiento que se ha establecido para las etapas localmente avanzadas (IBII-IVA) es la quimioterapia concomitante con radioterapia, administrando un agente radio-sensibilizador y posteriormente sometiendo al paciente a radioterapia, el agente radio-sensibilizador más utilizado en estas terapias es el **cisplatino** (Esquivel et al., 2011), que es un agente alquilante que forma aductos y entrecruzamientos en el DNA, provocando así daño en la doble cadena y muerte celular (Barabas, Milner, Lurie, & Adin, 2008).

En etapas tardías (IVB) cuando se ha presentado metástasis a órganos distales, la terapia es totalmente sistémica (Esquivel et al., 2011), en estos casos se opta por un esquema terapéutico que presente menor toxicidad para el paciente, empleando como agente radio-sensibilizador el **carboplatino**, en concomitancia con radioterapia (Lorusso, Petrelli, Coinu, Raspagliesi, & Barni, 2014).

ETAPAS LOCALMENTE AVANZADAS

La etapa en la que un tumor de cérvix se diagnostique es una acción de vital importancia para la decisión de un esquema terapéutico adecuado. La capacidad de la terapia convencional para etapas localmente avanzadas que es la quimio-radioterapia concomitante utilizando Cisplatino como agente radiosensibilizador está limitada en primera instancia por el tamaño del tumor, puesto que las dosis requeridas podrían exceder el nivel de citotoxicidad permisivo en un tejido normal de cérvix (Rose et al., 1999).

El estadio clínico también nos brinda una perspectiva sobre la posible supervivencia que pueda presentar un paciente. La supervivencia a 5 años en pacientes con tumores en estadio IA en promedio es del 100%, este porcentaje desciende al 70-

85% en tumores que se encuentren en estadio IB1-IIA, mientras que tumores en etapa localmente avanzada este porcentaje se vuelve variable, puesto que influyen factores como la invasión, edad y comorbilidad. En general, la supervivencia libre de enfermedad para las etapas IBII y IIB es de 50-70%, de 30 a 50 para las etapas III y solamente del 5 al 15% para la etapa IV (Waggoner, 2003). Esto resalta la importancia de estudiar los sucesos moleculares que ocurren en estas etapas del desarrollo tumoral.

El esquema terapéutico de la quimio-radioterapia concomitante se utiliza para abordar 2 objetivos, en primera instancia la radio-terapia se emplea para combatir la enfermedad local y en segunda instancia la quimioterapia es empleada para combatir la enfermedad sistémicamente (Steel & Peckham, 1979), sin embargo, las alteraciones epigenéticas cambian durante todas las etapas del desarrollo tumoral, estas alteraciones pueden derivar en la resistencia de algunos tumores de cérvix a la terapia convencional de dicha enfermedad y representa el estadio con mayor porcentaje diagnosticado en este tipo de cáncer (Dueñas-González et al., 2005).

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN CÁNCER

Es bien sabido que en la progresión tumoral muchos de los genes (tanto supresores tumorales como oncogenes) contienen alteraciones en su secuencia génica (Finlay, 1993), sin embargo, diversos estudios han demostrado que las alteraciones epigenéticas tienen un papel sumamente importante tanto en el desarrollo como en la progresión neoplásica (Bartosch, Lopes, & Jerónimo, 2017).

La epigenética engloba un conjunto de cambios o alteraciones heredables en la expresión genética, las cuales no están causadas ni pueden ser justificadas por alteraciones en la secuencia de nucleótidos. Estos cambios en la expresión génica son ocasionados por una variedad de procesos que llevan a cabo cambios en los estados estructurales de la cromatina que afectan la disponibilidad de las regiones promotoras para los factores de transcripción (Baylin & Ohm, 2006). Algunos de estos procesos de regulación epigenéticos son la presencia de RNAs no codificantes, modificaciones post-traduccionales de histonas y la **metilación del DNA** (Dawson et al., 2012).

La presencia de RNAs no codificantes; un ejemplo importante son los RNAs largos no codificantes, los cuales son reguladores clave en la producción de transcritos mediante la remodelación de estructural de la cromatina (Cao, 2014). Estas moléculas de RNA no codificante son necesarias para procesos biológicos como la inactivación del cromosoma X en mamíferos por el RNA no codificante Xist (Gontan, Jonkers, & Gribnau, 2011). Estas modificaciones pueden lograrlas mediante el reclutamiento de complejos proteicos involucrados en las modificaciones de histonas como es el Complejo Represivo Polycom (PRC por sus siglas en ingles), el cual es un complejo proteico formado por DNA e histona metil-transferasas que actúa principalmente en el residuo 27 Lys trimetilándolo, lo cual se considera una marca de represión transcripcional (Davidovich, Zheng, Goodrich, & Cech, 2013).

Un componente crucial de la cromatina relacionado a su estado estructural son las histonas, las cuales están sujetas a modificaciones pos-traduccionales como metilación, acetilación y fosforilación entre otras. La modificación en la estructura de la cromatina depende íntegramente de los residuos de aminoácidos en los que se encuentren estas modificaciones (Bannister & Kouzarides, 2011). La metilación ocurre principalmente en residuos de lisina y arginina, un ejemplo de esto es el de las marcas de tri-metilación hechas por las enzimas histona Metil-transferasa (HMTS) H3K9, H3K27 y H4K20 que indica una estructura de cromatina compacta llamada heterocromatina, mientras que la acetilación puntual en residuos de lisina en las histonas 3 y 4 por las Histonas Acetil-transferasas (HATS) tienen un papel esencial en la activación transcripcional (Bernstein et al., 2006), sin embargo, cada una de esas marcas dependiendo del nivel de metilación o acetilación generara un estado estructural de cromatina diferente. La regulación tanto de la metilación como de la acetilación de histonas en residuos específicos es de crucial importancia para mantener la homeostasis celular y la expresión basal de genes (Kouzarides, 2007).

La metilación del DNA ocurre principalmente en islas CpG, que son regiones del DNA donde se encuentran una gran densidad de dinucleótidos de citosina y guanina, la mayoría de estas islas CpG están situadas en regiones promotoras (Bartosch et al., 2017).

Este último mecanismo consiste en la adición de un grupo metilo al carbono 5 del anillo de ribosa de las citosinas, transformándola en una 5Metil citosina (5Mc) (Figura 7).

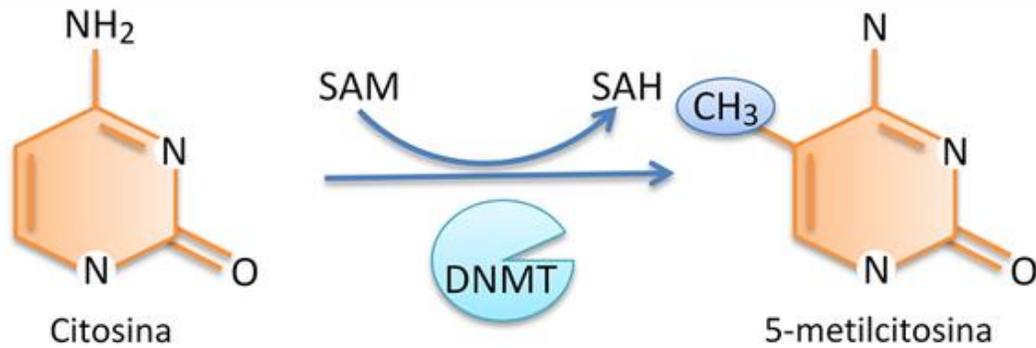


Figura 7 Metilación de citosinas. una metil-transferasa coloca un grupo metilo en el carbono 5 de una citosina transfiriéndola de una Sadenosil-metionina.

La metilación del DNA es una marca de represión transcripcional y una característica de la célula que le confiere identidad y es esencial en el desarrollo normal de la misma (Ziller et al., 2013), sin embargo se ha demostrado que la metilación aberrante del DNA es una de las alteraciones epigenéticas más importantes que dan como resultado la inestabilidad cromosómica y el silenciamiento de los genes encargados de evitar la aparición y desarrollo tumoral (Ohara et al., 2017).

Existen enzimas que se encargan de la desmetilación del DNA a las cuales se les denomina Diez Once Translocadoras metilcitosina dioxigenasa (TET por sus siglas en inglés) las cuales llevan a cabo la oxidación de las 5Mc en 5hidroximetilcitosina (5Hmc), a diferencia de los niveles de 5Mc que son relativamente estables en diversos tipos de tejidos, los niveles de 5Hmc son altamente específicos sobre todo en cerebro y bazo (Kraus et al., 2012). La función de la 5Hmc es evitar que proteínas como la proteína de unión a CpG metilada (MECP2 por sus siglas en inglés) que se relacionan con complejos de represión transcripcional se unan al DNA, ya que estas proteínas reconocen 5Mc y no 5Hmc, además de que las proteínas TET impiden la unión de DNMT's que puedan transferir grupos metilo a las citosinas (Branco, Ficz, & Reik, 2012). Se ha corroborado que la acción de las enzimas TET está ligado a mantener la homeostasis celular en diversos tipos de tejidos (Kriaucionis & Heintz, 2009). También existen estudios que han demostrado que la desregulación génica y mutaciones de las enzimas TET participan tanto en la carcinogénesis como en el desarrollo tumoral teniendo un papel clave en la regulación de los patrones de metilación y por tanto en la transcripción activa de genes (Rasmussen & Helin, 2016).

La metilación del DNA proporciona un mecanismo de señalización para un conjunto de proteínas que contienen dominios de unión a grupos metilo, MBP (Figura 8) por sus siglas en inglés (Methyl-CpG-Binding Proteins) (Bogdanović & Veenstra, 2009), las cuales, se encargan de censar la densidad de metilación en regiones que contengan dinucleótidos CpG y unirse a ellos, además de contar con dominios represores de la transcripción, dichos dominios se encargan de reclutar complejos proteicos que están involucrados en la remodelación de la cromatina (Herranz & Esteller, 2005). Un ejemplo de este mecanismo es la proteína llamada MeCP2 tiene la capacidad de reclutar histonas-desacetilasas, las cuales son esenciales para que ocurran eventos como la formación de heterocromatina y la reorganización de la misma (Du, Luu, Stirzaker, & Clark, 2015).

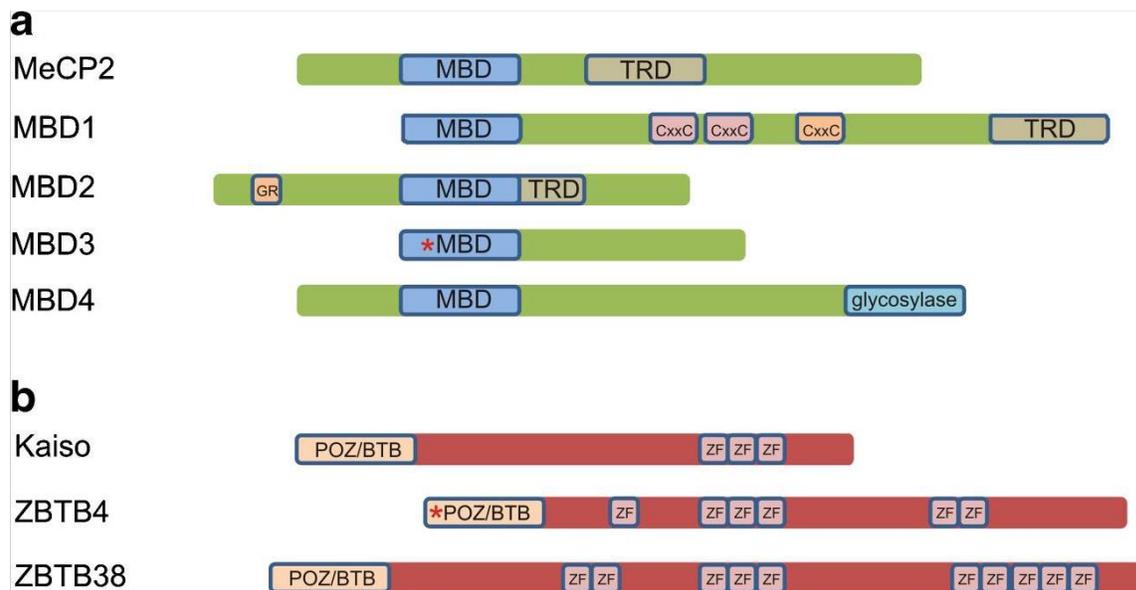


Figura 8. Proteínas de Unión a Grupo Metilo (MBP). Esquemmatización de los dominios de dos familias de MBP, donde se puede apreciar la similitud entre los integrantes de cada familia, a) la familia MBD, característica por contener en su estructura dominios de unión a grupo metilo (MBD) y el dominio de represión transcripcional. b) Otra familia de MBP llamada Kaiso, los cuales comparten el dominio POZ/BTB y pueden sentir la densidad CpG de las regiones del DNA mediante dominios de dedos de Zinc. Figura tomada de (Bogdanović & Veenstra, 2009)

Existen estudios que corroboran patrones diferenciales en el perfil de metilación tanto en distintos tipos de tejidos como en tejido normal y tumoral, estos patrones diferenciales tienen un impacto clínico-patológico importante puesto que afectan la expresión de genes, tanto supresores tumorales como oncogenes, lo cual está relacionado con el alto potencial de malignidad, agresividad y desenlace clínico (Ohara et al., 2017). Diversos estudios confirman que existe un patrón aberrante de metilación en las regiones promotoras de una gran cantidad de genes en neoplasias de cérvix (Chen et al., 2014).

LA METILACIÓN COMO UN BIOMARCADOR

Un biomarcador es una herramienta que brinda una perspectiva de un proceso biológico, es decir, una característica cuantificable u observable en un proceso biológico (Strimbu & Tavel, 2010). Uno de estos procesos es la metilación en regiones promotoras de genes específicos, la cual se encuentra entre las alteraciones que ocurren en etapas tempranas en un gran número de enfermedades y principalmente en el cáncer (Egger, Liang, Aparicio, & Jones, 2004), dada esta condición, se ha sugerido su utilización para una detección oportuna y el monitoreo de la progresión del cáncer (Delpu, Cordelier, Cho, & Torrisani, 2013).

Se han realizado diversos estudios para encontrar marcadores basados en patrones de metilación en distintos tipos de cáncer. Estos patrones de metilación nos proporcionan una amplia gama para la búsqueda de marcadores que puedan ser indicadores de estados biológicos, ya sea diagnóstico, pronóstico, opciones terapéuticas y desenlaces clínicos (Mikeska, Bock, Do, & Dobrovic, 2012)

Se ha mostrado que la metilación caracteriza distintos subtipos moleculares de cáncer, ya que, genes que modulan la respuesta a la terapia farmacológica son silenciados, como son el caso de los genes ABCB1 y SLC19A1 en células MDA-MB-231, los cuales codifican proteínas que tienen la función de transportadores de solutos hacia el interior de la membrana (Worm, Kirkin, Dzhandzhugazyan, & Guldborg, 2001) y la metilación de la región promotora de genes como p16 y

CDH13, debido a que funcionan como inhibidores de ciclinas dependientes de cinasa (Kurkjian, Kummar, & Murgu, 2008a), incluso, se ha propuesto como un biomarcador para detección temprana del carcinoma hepatocelular, la metilación de la región promotora de genes como p15, p16 y RASSF1A (Zhang et al., 2007).

Tomando en cuenta esta evidencia, la metilación del DNA puede ser una herramienta sumamente importante para **predecir la respuesta del paciente a los agentes terapéuticos**, así como el pronóstico de la enfermedad y el posible **desenlace clínico** (Maier, Dahlstroem, Haefliger, Plum, & Piepenbrock, 2005).

HIPÓTESIS

El perfil de metilación en tumores de cérvix es distingue los diferentes desenlaces clínicos en pacientes tratados con quimio-radioterapia concomitante.

OBJETIVOS

General: Determinar las diferencias en el patrón de metilación en tejido tumoral de pacientes con CC en etapa localmente avanzada que respondieron y que no respondieron al tratamiento de Cisplatino concomitante con radioterapia.

Particulares:

- Detectar genes que puedan ser considerados como biomarcadores basándonos en las diferencias en el nivel de metilación entre pacientes que respondieron y pacientes que no respondieron a la terapia.
- Analizar la secuencia de la región de los genes seleccionados como posibles biomarcadores.
- Validar los genes candidatos mediante Methylation-Specific PCR (MSP).

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DE TEJIDO

Para este estudio se utilizaron 66 biopsias de pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada (estadio FIGO IIB - IV), estas pacientes, posterior a la biopsia fueron sometidas a quimio-radioterapia concomitante utilizando como agente radiosensibilizador Cisplatino, 30 de los cuales no respondieron a la terapia (**NR**), 32 respondieron a la terapia (**R**) y 4 los cuatro restantes son biopsias de tejido de cérvix libre de displasia. Estos criterios se definieron de acuerdo con los nuevos criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST versión 1.1), estableciendo como respuesta la desaparición del tumor y todos sus signos, en el grupo de no respuesta se incluyeron pacientes con respuesta parcial, progresiva o enfermedad estable (Eisenhauer et al., 2009).

Para realizar los ensayos de microarreglo y como una cohorte de descubrimiento se analizaron 10 biopsias de pacientes NR, 12 biopsias de pacientes R y las 4 biopsias de tejido libre de displasia con las que se realizó el ensayo de microarreglo.

Las 40 biopsias restantes (20 biopsias R y 20 biopsias NR) se utilizaron para formar una cohorte de validación molecular de datos.

Tabla 1 Parámetros clinicopatológicos Descubrimiento. Parámetros de la muestra descubrimiento con la que se realizó el ensayo de microarreglo.

Características clínico-patológicas N= 22 (%)	
Tipo histológico	
Epidermoide	21, (95%)
Adenocarcinoma	1, (5%)
Estadio clínico (FIGO)	
IB2	1, (5%)
IIB	14, (64%)
IIIB	7, (32%)
Edad (29-63) años	
29-39	6, (27%)
40-50	9, (41%)
61-61	5, (23%)
Mayor a 61	2, (9%)
	= 46
Tamaño del tumor	
Mayor	9cm
Menor	0.7cm
	X= 5.23cm
Genotipificación VPH	
16	12, (57%)
52	4, (19%)
18	3, (14%)
58	2, (9%)
33	1, (5%)
31	1, (5%)
6	3, (14%)
59	2, (9%)
39	1, (5%)
Tratamiento	
Platinol	20, (91%)
Sin datos	2, (9%)
Respuesta al tratamiento	
Completa	12, (55%)
Progresiva	10, (45%)
Fallecida	6, (27%)

Tabla 2 Características Clinicopatológicas Validación. Parámetros del grupo de biopsias con las que se validaron los genes.

<u>Características Clinicopatológicas</u>	
<u>n = 40</u>	
Edad	
<ul style="list-style-type: none"> • Mayor • Menor • Media 	<ul style="list-style-type: none"> • 71 • 34 • 51
Tipo histológico	
<ul style="list-style-type: none"> • Epidermoide • Adenocarcinoma 	<ul style="list-style-type: none"> • 35 (87.5%) • 5 (12.5%)
Tamaño del tumor	
<ul style="list-style-type: none"> • < 4cm • > 4cm 	<ul style="list-style-type: none"> • 8 (20%) • 32 (80%)
Tratamiento	
<ul style="list-style-type: none"> • Cisplatino (Dicloro-Diamino-Platino) 	<ul style="list-style-type: none"> • 40 (100%)
Estadio FIGO	
<ul style="list-style-type: none"> • IIIA • IIB • IIIB • IVA • IVB 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 (12.5%) • 17 (42.5%) • 11 (27.5%) • 5 (12.5%) • 2 (5%)
Respuesta	
<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta completa (RC) • Enfermedad progresiva (EP) 	<ul style="list-style-type: none"> • 20 (50%) • 20 (50%)

MICROARREGLO Y ANÁLISIS.

El arreglo de DNA se realizó mediante la metodología aPRIMES (Figura 6), la cual es una metodología que se basa en la digestión enzimática del DNA con enzimas sensibles e insensibles a metilación (Figura 9). La muestra de DNA total se digiere con la enzima Msel para generar fragmentos en los que se puedan ligar un par de adaptadores (Figura 9, hexágonos rojos) para su posterior amplificación por PCRpf. Posterior a la ligación de los adaptadores, el DNA total se divide en dos partes de manera equitativa, una se digerirá con enzimas sensibles a metilación para obtener

la fracción metilada de DNA, la otra parte se digiere con una enzima que reconoce citosinas metiladas (McrBC) para obtener únicamente la fracción no metilada. Una vez hecho esto, se procede a la amplificación de los fragmentos de cada fracción por PCRpf, se marcan los fragmentos amplificados de ambas fracciones con fluoroforos (Cy3 & Cy5) y se realiza la hibridación competitiva en un chip (Pfister et al., 2007).

Una vez efectuado el marcaje, se realizó la hibridación como señala el manual “NimbleGen Array User’s Epigenetics Array – ChiP and DNA Methylation” sobre el Microarreglo 3X720K Format Human DNA Methylation 3X720K CpG Island Plus RefSeq Promoter Array.

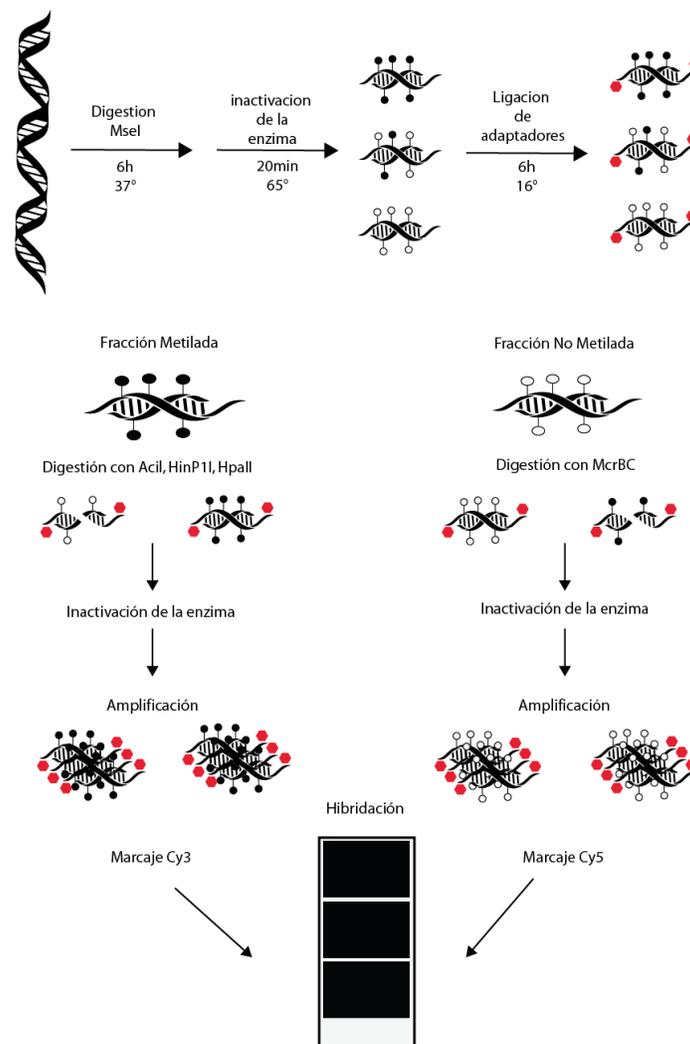


Figura 9. aPRIMES. Método para generar una matriz basada en un microarreglo con el cual se puede detectar el nivel de metilación de una región promotora.

El análisis de dicho microarreglo se llevó a cabo en el programa Microsoft Excel. En primera instancia, se obtuvieron 589 629 datos de diferentes regiones por cada muestra de paciente, las cuales fueron trasladadas a formato .TXT obteniendo el nombre del gen y la localización (Chr: pares de bases de inicio – pares de bases final). Los datos se compararon con el genoma de referencia GRCh38/hg38.

El Biweight Normalized Ratio, se obtuvo a partir del Log_2 (Cy5/Cy3) y el valor de Kolmogoróv-Smirnov (K-S Test) el cual se utiliza para verificar que los datos se ajustaran a una distribución normal.

Posteriormente, se organizaron los datos en dos grupos con forme a las biopsias, los pacientes que respondieron (R) y las que no respondieron al tratamiento (NR).

SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS

La selección de genes candidatos se llevó acabo, primero realizando una prueba de t de Student para comparar el valor de metilación (Biweight ratio) entre ambos grupos y obtener aquellas regiones que fueran estadísticamente significativas, se tomaron en cuenta solo aquellas regiones que tuvieran un valor de $p > = 0.05$. Para la realización de mapa de calor se calculó en Z score para cada valor del microarreglo de acuerdo a la formula $z = \frac{x-\mu}{\sigma}$.

Posteriormente se priorizaron aquellas regiones que tuvieran una mayor diferencia de medias entre los grupos de respuesta y no respuesta. Finalmente se verificó que las regiones priorizadas estuvieran localizadas en una isla CpG por medio de la herramienta en línea UCSC Genome Browser, como se ejemplifica en la figura 9.

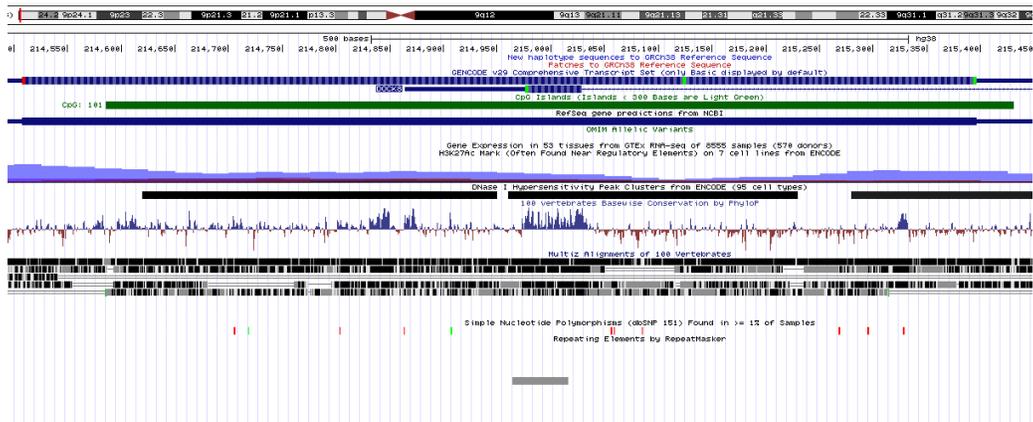


Figura 10. Localización de la región promotora. Herramienta en línea UCSC Genome Browser, la región promotora se encuentra en el cuadro azul delante del nombre del Gen, debajo, en verde, la isla CpG, con esto podemos corroborar que la región promotora está inmersa en una isla CpG y por tanto es susceptible a metilación.

Una vez verificados estos parámetros, se obtuvo la secuencia de cada gen candidato tomando desde 1000 nucleótidos río arriba hasta 1000 nucleótidos río abajo del sitio de inicio de la transcripción, debido a que en la mayoría de los casos las Islas CpG son de un tamaño mayor a las regiones promotoras. Estas secuencias se analizaron usando la herramienta en línea MethPrimer (Li & Dahiya, 2002). Los genes con una densidad CpG mayor al 60%, porcentaje requerido para ser tomado como isla CpG (Illingworth & Bird, 2009), fueron seleccionados para la validación.

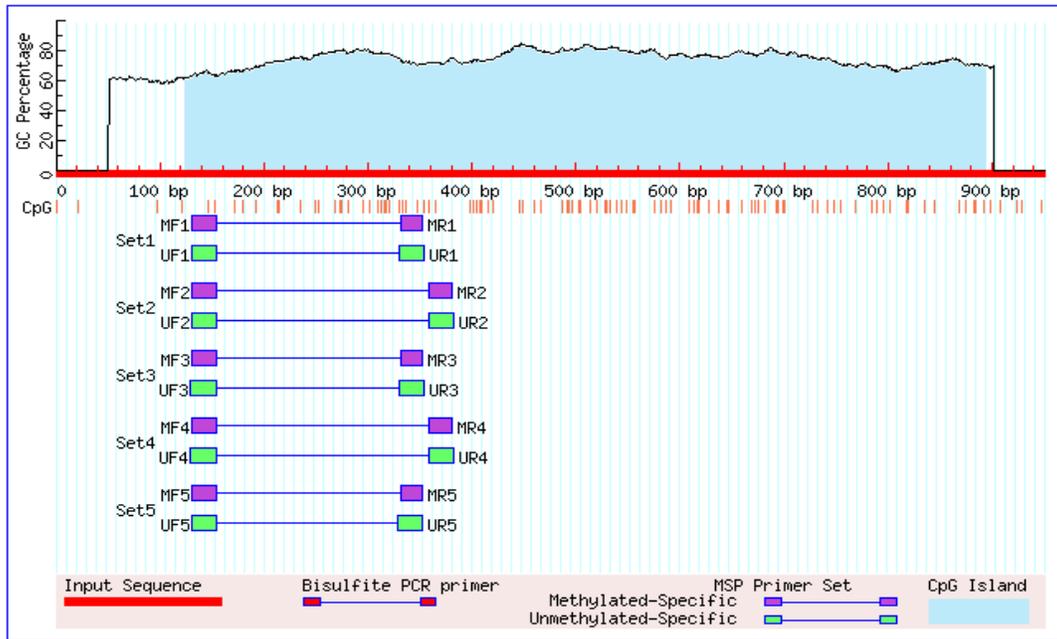


Figura 11. Densidad CpG. Herramienta en línea MethPrimer la cual funciona específicamente para diseñar oligonucleótidos con el fin de detectar metilación. La línea roja representa el tamaño de la secuencia que se ha introducido para ser analizada, en azul se puede observar la densidad CpG mostrada en porcentaje, en morado y verde se representan los sets de oligonucleótidos generados por el programa para realizar el ensayo de MSP posterior a la conversión por bisulfito.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para validar el estado de metilación de cada gen seleccionado, se diseñaron oligonucleótidos específicos usando el programa MethPrimer (Li & Dahiya, 2002). Los parámetros utilizados en el programa son los siguientes: El tamaño del amplicón se ajustó a un mínimo de 100, óptimo de 150 y máximo de 250, la TM de los oligonucleótidos se fijó en 50 mínima, 55 óptima y 60 máxima, el tamaño del oligonucleótido se condicionó a un mínimo de 20nt un óptimo de 22 y máximo de 25 (figura 11).

Los demás parámetros que son concernientes a la secuencia no fueron modificados.

Product Size:	Min: <input type="text" value="100"/>	Opt: <input type="text" value="150"/>	Max: <input type="text" value="250"/>
Primer Tm:	Min: <input type="text" value="50"/>	Opt: <input type="text" value="55"/>	Max: <input type="text" value="60"/>
Primer Size:	Min: <input type="text" value="20"/>	Opt: <input type="text" value="22"/>	Max: <input type="text" value="25"/>
Product CpGs:	<input type="text" value="4"/>	Primer Poly X:	<input type="text" value="5"/>
Primer non-CpG 'Cs:	<input type="text" value="4"/>	Primer Poly T:	<input type="text" value="8"/>

Figura 12. Parámetros de oligonucleótidos. Los parámetros tomados en cuenta para la generación de sets de primer con los que se realizara el ensayo MSP, el tamaño del amplicón en un rango de 100 a 250, las TMs de los oligonucleótidos de entre 50° y 60°, además de especificar que el tamaño del primer debía oscilar entre los 20 y los 25nt, los parámetros restantes que muestra la página para la generación de dichos oligonucleótidos no fueron modificados.

Tabla 3 Oligonucleótidos. Oligonucleótidos diseñados para realizar el ensayo de MSP.

Nombre		Metilado	No metilado
BRD9	Fw	GAATTTTTTATTAGGAACGTAAGCG	GAATTTTTTATTAGGAATGTAAGTG
	Rv	CTACGAAAATAAAACGACGACG	TCCTACAAAATAAAACAACAACAC
CTU1	Fw	CGAGTAGTTGGGATTATAGGTTTAC	TTTTGAGTAGTTGGGATTATAGGTTTAT
	Rv	AAAAAATCTAAAAAAAACGCGAA	ATCAAAAATCTAAAAAAAACACAAA
DOCK8	Fw	AGTTTAGCGTTGGTGTGAAGC	GATAGTTTAGTGTTGGTGTGAAGTG
	Rv	GAAACGAACGAAATTATTTCGAAA	ACAAAACAAACAAAATTATTCAAAA

Se obtuvieron 2 pares de oligonucleótidos por cada región seleccionada, un par de oligonucleótidos corresponden a la secuencia metilada (Primer M) y el otro par a la secuencia no metilada (Primer U). La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos se muestra en la Tabla 3.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

De cada una de las 66 biopsias de pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada, se tomaron 20mg de tejido fresco que se colocó en tubos Fisherbrand™ Bead Mill Homogenizer 2ml Soft tissue homogenizing Mix Tube. En los tubos fueron previamente adcionados 500µl de buffer de lisis (10mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 1% SDS). El tejido se homogenizó utilizando el equipo MagNA Lyser instrument® a 6000 rpm durante un minuto.

Una vez homogenizado el tejido en el Buffer de lisis, se procedió a la utilización del Kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN®) el cual utiliza columnas para el aislamiento y la posterior elución del DNA (Figura 12). Para ejecutar dicho protocolo se siguieron las instrucciones del fabricante. El DNA se recuperó en un tubo eppendorf de 1.5ml y se almacenó a -20°.

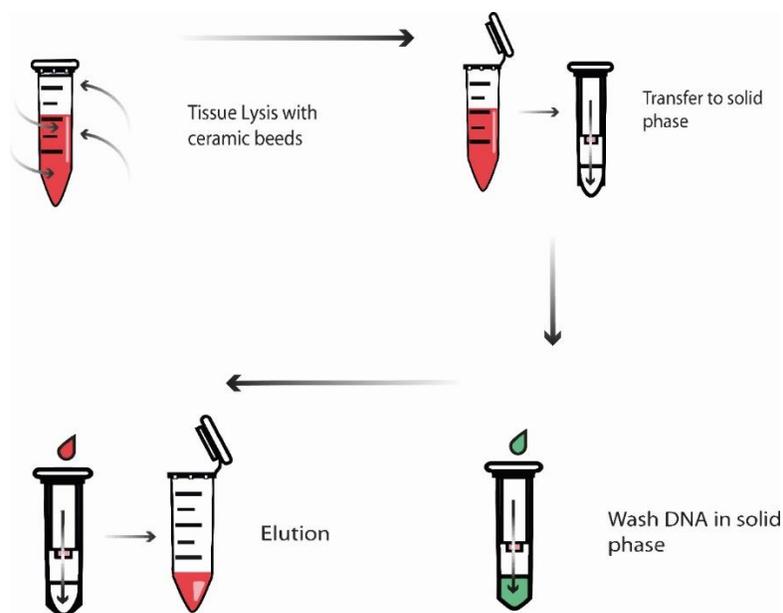


Figura 13. Extracción de DNA de tejido. Esquemmatización de los pasos que tienen lugar en la extracción de DNA a partir de tejido, en primera instancia el tejido debe ser macerado con perlas de cerámica, en un tubo Eppendorf, en este caso, se utilizó el equipo MagNA Lyser, en segunda instancia, se transfiere la emulsión a una fase sólida en una columna que es parte del Kit QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini KIT, en esta fase solida el DNA quedará adherido a una resina que contiene la columna, posterior a eso se lavara un par de veces con el buffer de lavado que contiene el Kit para retirar el exceso de sales, después de llevarse a cabo el par de lavados se procede a la elución del DNA adherido a la resina, el DNA puede utilizarse inmediatamente o almacenarse en el congelador a -20°.

CONVERSIÓN POR BISULFITO

Para la conversión por bisulfito utilizamos el Kit EZ DNA Methylation-Direct™, se realizó tomando 500µg de DNA de biopsia previamente extraído, se colocó en un tubo para PCR Axygen® y se llevó a un volumen de 20µl (la conversión por bisulfito se realiza una reacción para cada biopsia por separado), posterior a eso, se agregaron 120µl de CT Conversion Reagent previamente preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se incubó en un termociclador bajo los siguientes parámetros de temperatura y tiempo:

- 98° C durante 8 minutos
- 68° C durante 3.5 horas
- 4° C para finalizar la reacción

Una vez terminada la incubación, se trasladó la muestra a la columna del Kit agregando 600µl de M-Binding Buffer y se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 segundos. Una vez adherida la muestra a la fase sólida, se lavó para descartar los remanentes de sales y de iones sulfito con M-Wash Buffer. Finalmente, el DNA se recuperó en 15µl de buffer de elución (M-Elution Buffer). La concentración promedio de cada muestra recuperada fue de 45ng/µl.

Para usarse como control positivo y negativo se hizo la conversión por bisulfito de DNA 100% metilado y DNA 100% no metilado, que fueron adquiridos en el set Human Methylated & Non-Methylated DNA Set®.

ENSAYO DE MSP (METHYLATION SPECIFIC-PCR)

El ensayo se llevó a cabo realizando 2 reacciones de PCR punto final por muestra, una reacción con el par de oligonucleótidos M y otra reacción colocando el par de oligonucleótidos U. En cada reacción, se colocó en un tubo de PCR Axygen ≈ 45ng de DNA modificado con Bisulfito y los componentes del Kit de GoTaq Promega®; 5µl de 5X Green GoTaq Reaction Buffer, 2.5mM de MgCl₂, .25µM de cada uno de los DNTP's, .6µM de primer Fw, .6µM de primer Rv, 1U de enzima GoTaq Polimerasa y una cantidad de H₂O grado biología molecular suficiente para llevar la reacción a un volumen final de 25µl.

La reacción se sometió a un patrón de termociclado que consistió en una desnaturalización inicial a 95° durante 2 minutos, posteriormente 35 ciclos con los siguientes parámetros

- Desnaturalización, 95° durante 30 segundos.
- Alineamiento, Temperatura de alineamiento según el primer durante 30 segundos (Ver tabla 3).
- Extensión, 72° durante 30 segundos.

Una extensión final de 72° durante 5 minutos y termina la reacción a 4° para retirarla del termociclador.

Las reacciones control para los oligonucleótidos de cada región, se realizaron con DNA 100% metilado Y 100% no metilado previamente sometido al tratamiento por Bisulfito. En la reacción de control negativo de la PCR se sustituyó la cantidad de DNA modificado con Bisulfito por H₂O grado biología molecular.

Tabla 4 Características de los oligonucleótidos. Características tomadas en cuenta para realizar el termociclado.

Gen		Temperatura De Alineamiento(°C)	Tamaño De Amplicon
BRD9	U	59	141
	M	59.5	140
CTU1	U	59.5	146
	M	58	146
DOCK8	U	59	141
	M	58.5	142

Posterior a la incubación, se sometió a electroforesis una cantidad de 10µl de reacción en un gel de agarosa al 2% (P/V) preparado con Buffer TBE (Tris-Borato 90Mm, EDTA 2Mm, pH 8), a una concentración de Bromuro de Etidio de 1µg/ml. Para determinar el tamaño del amplicon en el gel, se colocaron en el primer carril 2µl de marcador de peso molecular GenRuler 100pb DNA Ladder (Thermo Scientific®). La electroforesis se llevó a cabo en un sistema de electroforesis en

minigel OWL™ Easy Cast™ B2 Thermo Scientific, con un voltaje de 90V durante 45min. El resultado de la electroforesis se fotodocumentó por medio de un transluminador Gel Doc™ EZ Imager (Bio Rad).

EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES (QPCR)

Para medir la expresión de los genes BRD9, CTU1 y DOCK8 se realizó una extracción de RNA total tomando 20mg de tejido fresco. El tejido se colocó en un tubo Fisherbrand™ Bead Mill Homogenizer 2ml Soft tissue homogenizing Mix Tube que contenía 500µl de Trizol®. Posteriormente, se homogenizó en el equipo MagNA Lyser durante 1 minuto a 6000rpm. Una vez lisado el tejido, se trasladó la emulsión a un tubo nuevo de 1.5ml y se agregaron 300µl de cloroformo, centrifugando la muestra a 12 500rpm durante 15 minutos con el fin de separar la fase orgánica y así poder purificar el RNA.

Una vez que hayamos obtenido el RNA de la muestra, se procedió a realizar la precipitación de la muestra colocando 500µl de isopropanol y fue centrifugado a 12500rpm durante 30 minutos hasta que fue visible el pellet en la punta del tubo. Después se descartó el isopropanol y la muestra fue lavada con Etanol a una concentración de 70%. Las muestras se centrifugaron a una velocidad de 7 500rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se descartó. Al final, se resuspendió en 30µl de H₂O pureza grado molecular.

Con el fin de generar DNA complementario (cDNA) a partir del RNA extraído anteriormente, se realizó para cada muestra de RNA una reacción de retrotranscripción. Para lo cual se usaron 200ng de RNA total con el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. La reacción para cada una de las muestras se llevó a cabo colocando 2µl de 10X RT Buffer, 0.8µl de 25X dNTP Mix (100mM), 1µl de RT Random Oligonucleótidos, 200ng de RNA, 1µl de RNase Inhibitor, 1µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, ajustando el volumen de la reacción a 20µl con agua de pureza grado molecular.

Una vez preparadas las reacciones en tubos para PCR Axygen, se sometieron a un patrón de termociclado que consiste en lo siguiente:

- 25° durante 10 minutos
- 37° durante 120 minutos
- 85° durante 5 minutos
- 4° ∞

Para realizar la reacción de qPCR se utilizó, por cada una de las muestras de RNA, 1µl de su respectivo cDNA y se preparó la reacción para PCR cuantitativa de acuerdo a las especificaciones del Kit Luminaris HiGreen qPCR Master Mix; 10µl de 2X Master mix, 1µl cDNA, 0.6µl primer Fw 10mM, 0.6µl primer Rv 10mM, adicionar la cantidad de H₂O de pureza grado biología molecular para llevar la reacción a un volumen de 20µl.

Los oligonucleótidos para medir la expresión relativa de cada uno de estos genes fueron generados en la herramienta en línea de NCBI Primer-BLAST utilizando como templado la secuencia de mRNA especificando que uno de los primer debía localizarse en una unión entre exones, así nos aseguramos que únicamente nuestro templado es mRNA maduro, los oligonucleótidos generados son los siguientes:

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	TTCTGCCCGGAGAACCCGA	20	65.88	65.00	10.00
Reverse primer	CCGGCGAGCACCGTGTGCA	19	68.44	73.68	6.00

Products on target templates

>[NM_145232.4](#) Homo sapiens cytosolic thiouridylase subunit 1 (CTU1), mRNA

```
product length = 165
Forward primer 1 TTCTGCCCGGAGAACCCGA 20
Template       54 ..... 73
Reverse primer 1 CCGGCGAGCACCGTGTGCA 19
Template       218 ..... 200
```

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	CACACCTGAACAGCCTGGAT	20	59.96	55.00	5.00
Reverse primer	CCAGTTC AACCCCTCCTCC	20	59.96	60.00	5.00

Products on target templates

>[XM_011518047.3](#) PREDICTED: Homo sapiens dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8), transcript variant X5, mRNA

```
product length = 135
Forward primer 1 CACACCTGAACAGCCTGGAT 20
Template       270 ..... 289
Reverse primer 1 CCAGTTC AACCCCTCCTCC 20
Template       404 ..... 385
```

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity
Forward primer	GCTTCAGAGATCCCCATG	18	54.41	55.56	4.00
Reverse primer	ACACGGTATCTGGCCTAT	18	54.52	50.00	4.00

Products on target templates

>NM_001009877.2 Homo sapiens bromodomain containing 9 (BRD9), transcript variant 2, mRNA

```
product length = 207
Forward primer 1 GCTTCAGAGATCCCCATG 18
Template       452 ..... 469
Reverse primer 1 ACACGGTATCTGGCCTAT 18
Template       658 ..... 641
```

Figura 14. Oligonucleótidos para qPCR. Diseñados en la herramienta en línea de NCBI primer-BLAST, podemos observar el primer par de oligonucleótidos para qPCR de cada uno de los genes candidatos con las respectivas características de tamaño, TM y CG%.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler® 480 System (96 well plates) programado para ciclar las siguientes condiciones de temperatura:

- 50° 2 minutos de pre-incubación.
- 95° 5 minutos desnaturalización inicial.

45 ciclos con las siguientes temperaturas:

- 95° 15 segundos de desnaturalización.
- Para el alineamiento se tomó la temperatura estandarizada por PCRpf para cada par de oligonucleótidos (DOCK8: 66°, CTU1: 68°, BRD9: 65°) 35 segundos.
- 72° de extensión durante 30 segundos.

Los resultados se compararon con un gen de referencia, que en este caso fue GAPDH y se graficó $2^{-\Delta\Delta ct}$.

RESULTADOS

ANÁLISIS GLOBAL DEL ESTADO DE METILACIÓN

En este trabajo nos dimos a la tarea de buscar posibles biomarcadores de respuesta a tratamiento en cáncer de cérvix basándonos en el patrón de metilación global de pacientes que respondieron y pacientes que no respondieron a la quimio-radioterapia concomitante. Aplicando la prueba de t de Student obtuvimos 5120 regiones con una significancia estadística de p menor o igual a 0.05 las cuales se observan en el mapa de calor (Figura 15). Agrupamos estas regiones en biopsias de pacientes que respondieron (Figura 15 agrupados en rojo) y pacientes que no respondieron (Figura 15 agrupados en azul) a la quimioterapia de Cisplatino concomitante con radioterapia.

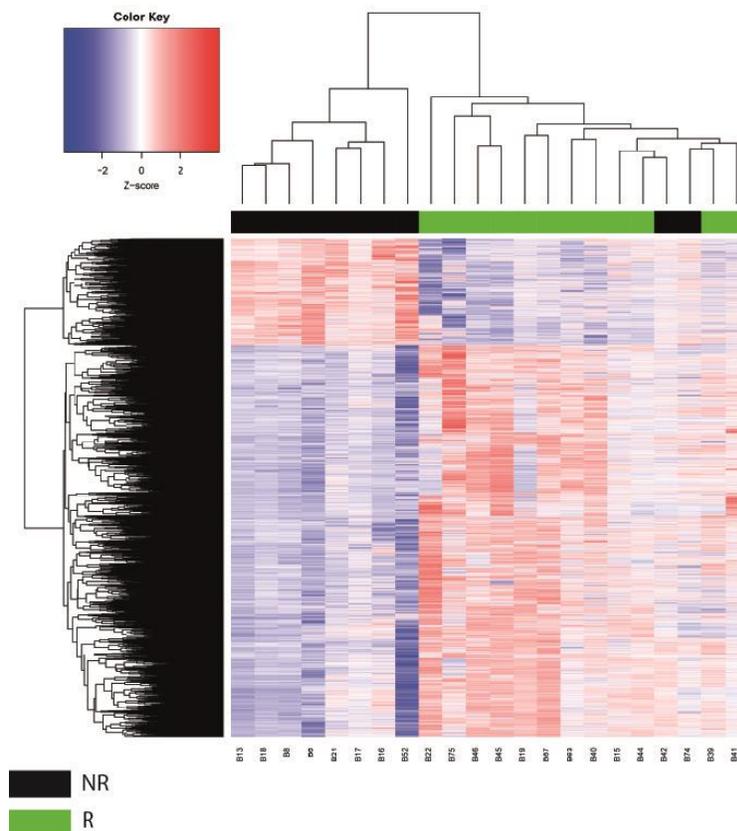


Figura 15. Mapa de Calor. Con el código de colores podemos observar la diferencia en los perfiles de metilación entre biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento (verde) y biopsias de pacientes que

no respondieron al tratamiento (negro). Podemos ver que solamente 2 biopsias no se ajustaron a la distribución normal.

Observando este mapa de calor nos damos cuenta que el Z score de las regiones en ambos grupos se correlaciona negativamente (Figura 15, distinción de colores rojo y azul en ambos grupos), esto quiere decir que existe un patrón de metilación característico en pacientes que responden al tratamiento como en pacientes que no responden al tratamiento.

Comparando estas regiones se eligieron genes candidatos que presentan un mayor contraste en el nivel de metilación entre el grupo R y el grupo NR, además de contener una densidad CpG mayor al 60%. Se eligieron 14 genes que contaran con estas características, los cuales se esquematizan en la Tabla 14.

Tabla 5 Genes candidatos. Los genes que cumplieron los criterios de selección establecidos.

KIAA1539	FLT1
DCTPP1	HPS1
STAG3L3	RNASEH2A
CTU1	BRD9
SLC17A7	PRPF40B
EPB41L1	TUBGCP2
DOCK8	SNX17

La secuencia de cada uno de estos genes se obtuvo de la base de datos UCSC Genome Browser y la densidad CpG se calculó utilizando la herramienta en línea MethPrimer, de este grupo se seleccionaron los que tuvieran mayor densidad CpG en su secuencia analizada, los cuales fueron *BRD9*, *CTU1* y *DOCK8*.

El gen *BRD9* (Bromodomain Containing 9) el cual codifica una proteína que lleva el mismo nombre y funciona como un módulo de interacción de proteínas que reconoce específicamente dominios de acetilación de Lisinas, esto se ha reportado como un evento clave en la lectura de marcas epigenéticas (Filippakopoulos et al., 2012). Se ha reportado que las alteraciones en *BRD9* están relacionadas con la proliferación celular y en cáncer de pulmón su sobreexpresión está relacionada con un mal pronóstico (Huang et al., 2019).

El análisis de la secuencia de nucleótidos que corresponde desde 1000nt río arriba del sitio de inicio de la transcripción hasta 1000nt río abajo de la misma, mostro que el 65% de esta secuencia, como podemos ver en la Figura 16, tiene una densidad GpG mayor al 60% que está representada con la sombra azul. El programa MethPrimer además de mostrar la densidad CpG de la secuencia, genera oligonucleótidos específicos para validar su estado de metilación. El programa MethPrimer generó dos pares de oligonucleótidos para la validación por MSP, los cuales, como podemos ver en la figura 16, amplifican un fragmento de 141pb el cual está representado por las flechas blancas dentro del área sombreada en azul.

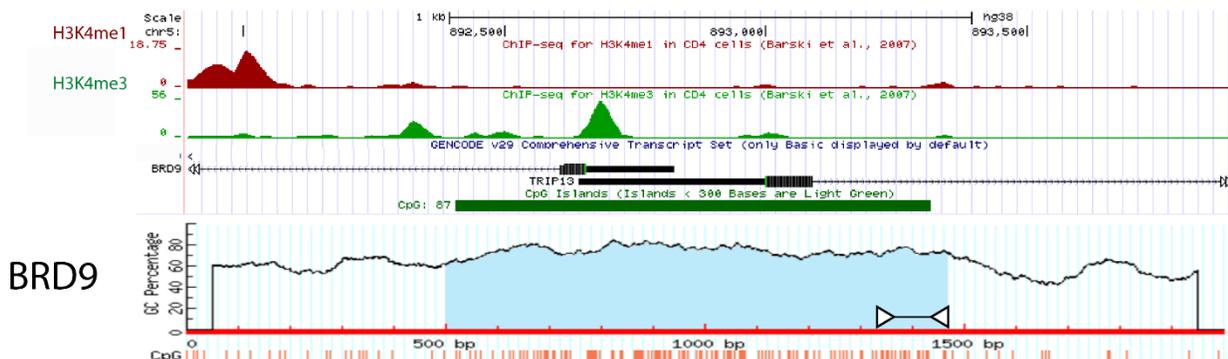


Figura 16. Densidad CpG BRD9. Mediante la herramienta online UCSC Genome Browser ubicamos la región promotora de BRD9 representada por la caja en negro, debajo (línea verde) observamos la representación de una isla CpG en la que se encuentra dicha región promotora. El análisis de la secuencia muestra que la densidad CpG de la isla es mayor al 60% representado por la sombra azul. Las flechas dentro del área sombreada indican la región que amplificamos para la validación por MSP.

La proteína que codifica en gen *CTU1* (Cytosolic Thiouridylase Subunit 1) juega un papel crucial en el procesamiento del RNA de transferencia modificando nucleósidos para el cierre apropiado del anticodón, garantizando así la fidelidad de la traducción por el ribosoma (Dewez et al., 2008). La sobre-expresión de este gen aunado a la proteína del complejo de elongación (*Efp3* por sus siglas en inglés) ha sido reportada en cáncer de mama como un evento que promueve la invasión celular (Delaunay et al., 2016). Al analizar la secuencia de la región promotora de *CTU1* encontramos que un 60% de la longitud de esta secuencia contiene una densidad CpG mayor al 60% (Figura 17) que se puede apreciar con las zonas sombreadas de azul. Esta región cumplió con el mínimo requerimiento para que una isla CpG pueda estar sujeta a metilación, la cual es contar con un mínimo de densidad de dinucleótidos citosina-guanina de 60% en su secuencia. Para validar el estado de metilación por medio de MSP de dicha región amplificamos un fragmento de 146pb que se muestra en la figura 17 representado por las flechas blancas dentro del área sombreada en azul.

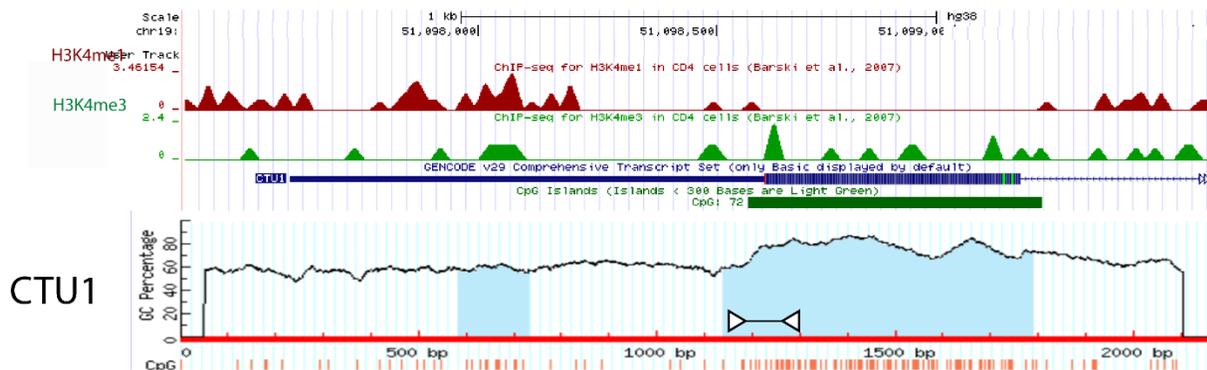


Figura 17. Densidad CpG *CTU1*. Mediante la herramienta online UCSC Genome Browser ubicamos la región promotora de *CTU1* representada por la caja en azul, debajo (línea verde) observamos la representación de una isla CpG en la que se encuentra dicha región promotora. El análisis de la secuencia muestra que la densidad CpG de la isla es mayor al 60% representado por la sombra azul. Las flechas dentro del área sombreada indican la región que amplificamos para la validación por MSP.

DOCK8 (Dedicator Of Cytokinesis 8) codifica una proteína que funciona como factor de intercambio de nucleótidos de guanina, esta familia de proteínas interactúa con Rho GTPasas involucradas en eventos de señalización de vías involucradas en reordenamiento de citoesqueleto y migración celular. De las tres secuencias que hemos analizado, esta fue en la que pudimos encontrar mayor densidad CpG. Esta secuencia tomada desde 1000nt río arriba hasta 1000nt río abajo del sitio de inicio de la transcripción de *DOCK8* contiene en el 75% de su secuencia una densidad CpG mayor al 60% (Figura 18). Los oligonucleótidos arrojados por el programa MethPrimer amplifican fragmento de 142pb representado por las flechas blancas dentro del área sombreada en azul en la figura 18.

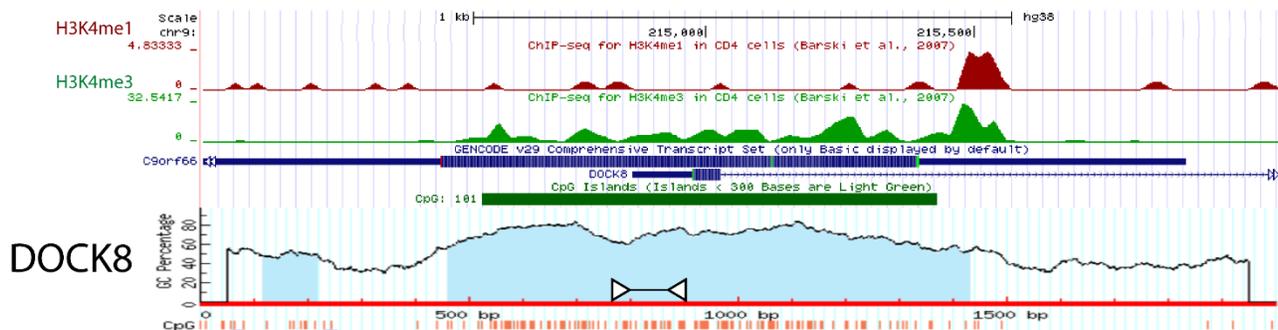


Figura 18. Densidad CpG *DOCK8*. Mediante la herramienta online UCSC Genome Browser ubicamos la región promotora de *DOCK8* representada por la caja en azul, debajo (línea verde) observamos la representación de una isla CpG en la que se encuentra dicha región promotora. El análisis de la secuencia muestra que la densidad CpG de la isla es mayor al 60% representado por la sombra azul. Las flechas dentro del área sombreada indican la región que amplificamos para la validación por MSP.

Para obtener un panorama general del estado de metilación de estos genes verificamos los datos obtenidos en el microarreglo de metilación. Tomando los valores de Biweight Ratio (B-Values) que utilizamos para comparar las regiones promotoras de estos genes en ambas cohortes (NR y R), realizamos graficas de caja-brazo (Figura 15). La comparación entre estos B-Values nos muestra un panorama de los niveles de metilación de las regiones promotoras. Para el gen *BRD9* los pacientes NR tiene un valor de 1.5 comparado con 0.5 en los pacientes R. De forma similar el B-Value para el gen *CTU1* es mayor en pacientes con NR (3.2) comparado con los pacientes con R (1.6). En contraste para el gen *DOCK8* la cohorte NR tiene un valor menor (-1.5) comparado con el valor en la corte R (0.5).

Estos datos sugieren que el nivel de metilación en las regiones promotoras de BRD9, CTU1 y DOCK8 se correlaciona negativamente entre ambas cohortes.

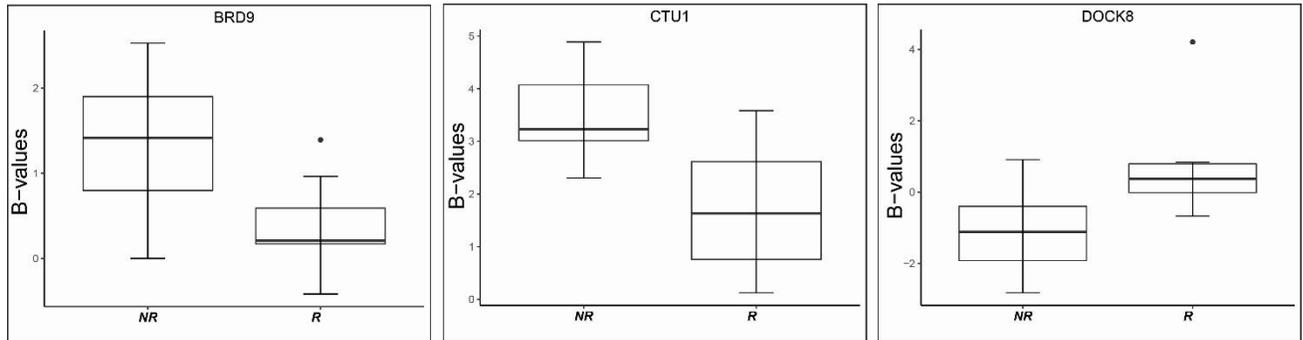


Figura 19 B – Values. En la figura podemos apreciar la comparación de los B – Values (Beweit Ratio) de los genes BRD9, CTU1 y DOCK8 obtenidos del microarreglo de metilación, esta comparación se realizó con la cohorte de biopsias que no respondió al tratamiento (NR) contra la cohorte de biopsias que respondió al tratamiento (R)

EL NIVEL DE METILACIÓN ES DISTINTIVO EN PACIENTES QUE RESPONDIERON Y EN PACIENTES QUE NO RESPONDIERON AL TRATAMIENTO.

Validamos la región promotora de los genes BRD9, CTU1 y DOCK8, para lo cual empleamos una nueva cohorte de 40 biopsias de pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada tratadas con Cisplatino como agente radiosensibilizador en quimio-radioterapia concomitante, de las cuales 20 respondieron a dicha terapia y 20 no tuvieron respuesta, el DNA genómico de estas muestras sometido a modificación con bisulfito fue utilizado para realizar ensayos de PCR Especifica para metilación (MSP por sus siglas en inglés). Este ensayo es una manera indirecta de medir el estado de metilación de una región.

La conversión por bisulfito es una modificación química del DNA para medir indirectamente su estado de metilación, ya que la muestra de DNA se somete a una incubación en presencia de iones sulfito por un lapso de 3 horas y posteriormente

se traslada a una fase sólida, en este proceso, las citosinas que no contengan un grupo metilo unido al carbono 5 (Citosinas no metiladas) atravesaran una serie de modificaciones químicas, con lo que cambiaran su estructura a la de un Uracilo (U). En caso de que las citosinas contengan el grupo metilo (Citosina Metilada), los iones sulfito no pueden interactuar con dichas citosinas, por lo que su estructura química no se modificara y la secuencia se mantendrá tal cual está (M) (Figura 13).

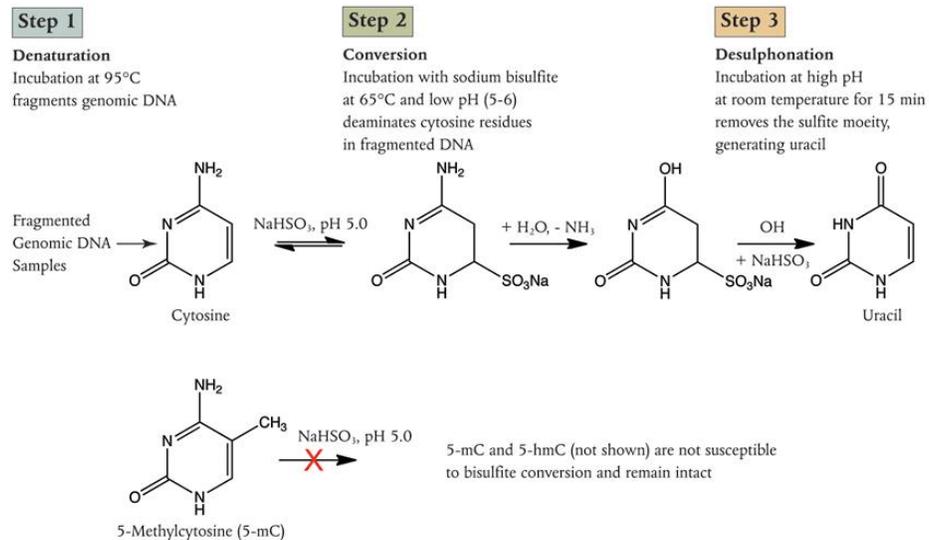


Figura 20. Conversión por Bisulfito. Es un proceso de reacciones químicas las cuales modificaran la secuencia de DNA, en específico las citosinas de acuerdo al estado de metilación, la muestra se incuba durante tres horas a 65° en presencia de iones sulfito, con lo cual el grupo de sales sulfito se unirá al carbono 6 del anillo de ribosa de la citosina además de ocurrir reacciones de desaminación, para retirar el grupo sulfito es necesario trasladar la muestra a una fase sólida que está contenida en las columnas de KIT de conversión por bisulfito, posterior a los lavados, la muestra se eluye para ser utilizada para los ensayos de MSP. En el caso de que la citosina esté metilada no es susceptible a que el grupo sulfito no puede incorporarse a la citosina y permanecerá intacta.

Con el fin de validar el nivel de metilación en la región promotora de los genes BRD9, DOCK8 y CTU1, seleccionados como candidatos se realizó el ensayo de Methylation Specific-PCR (MSP), este ensayo es una manera indirecta y cualitativa de corroborar el estado de metilación de una región, a partir de una muestra de DNA modificada por medio de iones bisulfito.

Para la interpretación del ensayo de MSP, se toma en cuenta el patrón de bandeo en el gel de agarosa, las bandas indicarán el nivel de metilación como se muestra en la Figura 19.

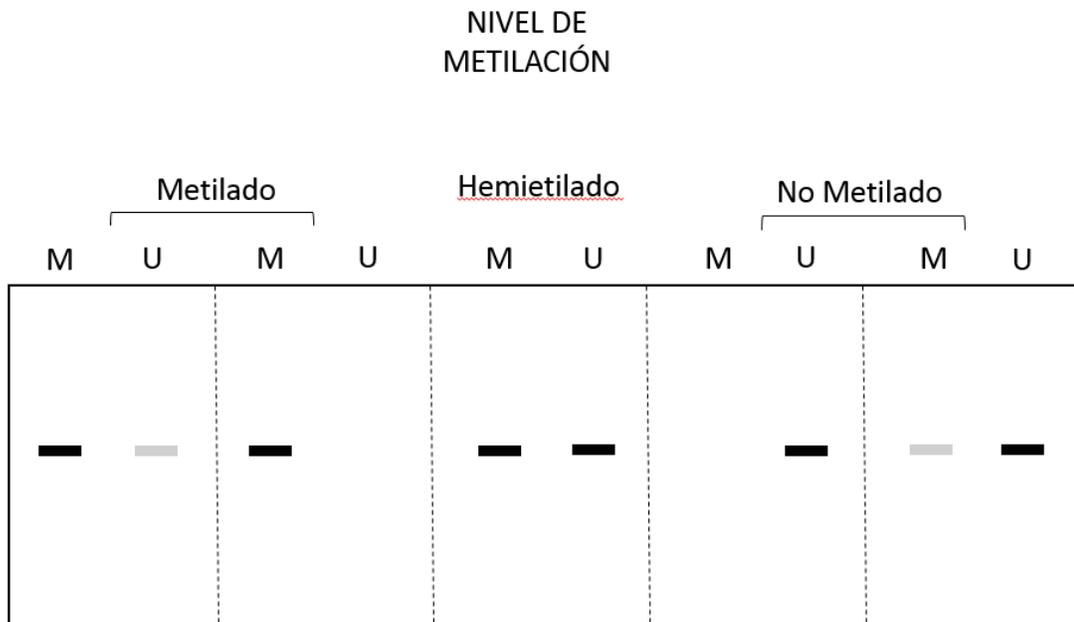


Figura 21. Criterio de valoración de MSP. Las bandas mostradas en el gel de agarosa indicaran el estado de metilación evaluada que puede ser; A) 100% Metilado, solamente amplifican los primer diseñados para DNA metilado. B) 0.1 – 99.9% Hemimetilado, amplifican ambos pares de oligonucleotidos. C) 0% Desmetilado. Solamente amplifica el par de oligonucleótidos para DNA no metilado.

Al validar el estado de metilación de la región promotora de BRD9 mediante PCR punto final con los oligonucleótidos diseñados en el programa MethPrimer, obtuvimos una amplificación del par de oligonucleótidos M en todas las muestras de pacientes de la cohorte R (Figura 22 R), lo que nos indica que esta región se encuentra metilada, mientras que en el grupo de biopsias de pacientes de la cohorte NR la amplificación tuvo lugar tanto para el par de oligonucleótidos M como para el U en 18 pacientes de la cohorte NR, por tanto la región se encontró hemimetilada (Figura 22 NR).

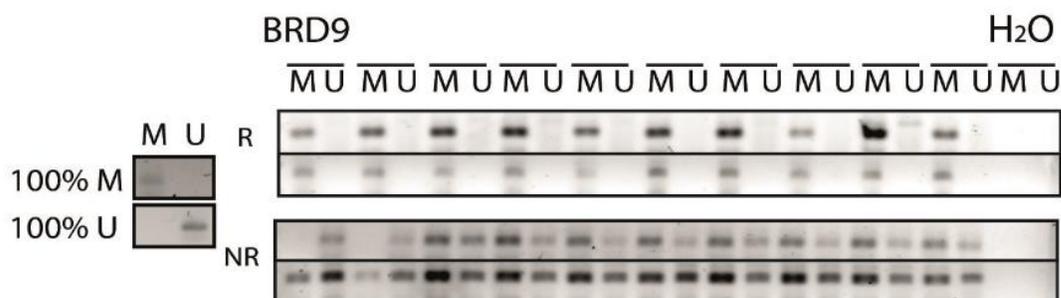


Figura 22. MSP BRD9. Ensayo de MSP para el gen BRD9, R) biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento, las acotaciones M y U corresponden a Metilado y No metilado respectivamente, en la parte derecha se encuentran los controles de amplificación con DNA 100% metilado y DNA 100% no metilado.

En el resultado de la validación por MSP de la región promotora de CTU1, podemos observar que en la cohorte de pacientes R en la totalidad de los pacientes la amplificación de esta región promotora ocurre con el par de oligonucleótidos U, lo que nos lleva a concluir que se encuentra desmetilada en esta cohorte (Figura 23 R), mientras que, en 19 de las de las 20 biopsias de la cohorte de pacientes NR la amplificación ocurrió con ambos pares de oligonucleótidos (M y U) lo cual muestra la clara tendencia de esta región a un patrón de hemimetilación pacientes NR (Figura 23 NR).

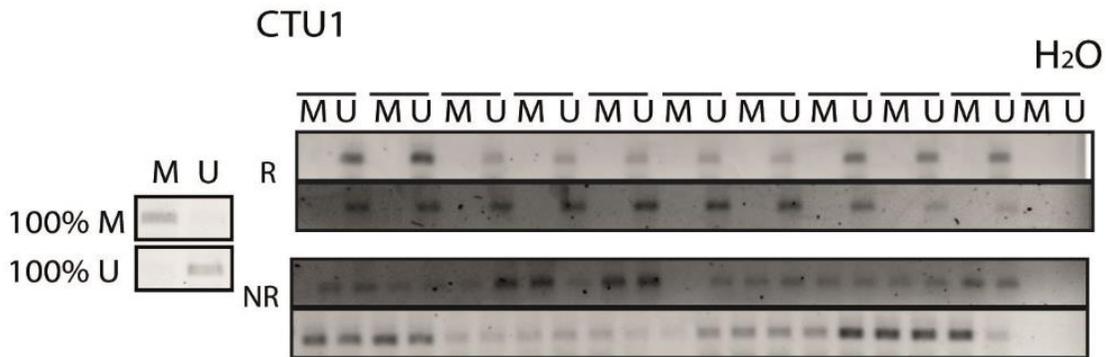


Figura 23. MSP CTU1. Ensayo de MSP para el gen BRD9, R) biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento, las acotaciones M y U corresponden a Metilado y No metilado respectivamente, en la parte derecha se muestran los controles de amplificación con DNA 100% metilado y DNA 100% no metilado.

Al llevar a cabo la validación de DOCK8 en los grupos de biopsias R y NR observamos que en 17 de las muestras del grupo R amplificaron ambos pares de oligonucleótidos (M y U), lo que sugiere que esta secuencia tiene un patrón de hemimetilación (Figura 24 R). Sin embargo, en el grupo de biopsias de pacientes NR puede verse una amplificación solo del par de oligonucleótidos U en 8 muestras y en 10 muestras más de la misma cohorte la amplificación de los oligonucleótidos U es más robusta (Figura 24 NR), lo que sugiere la tendencia de esta región a la desmetilación en pacientes NR.

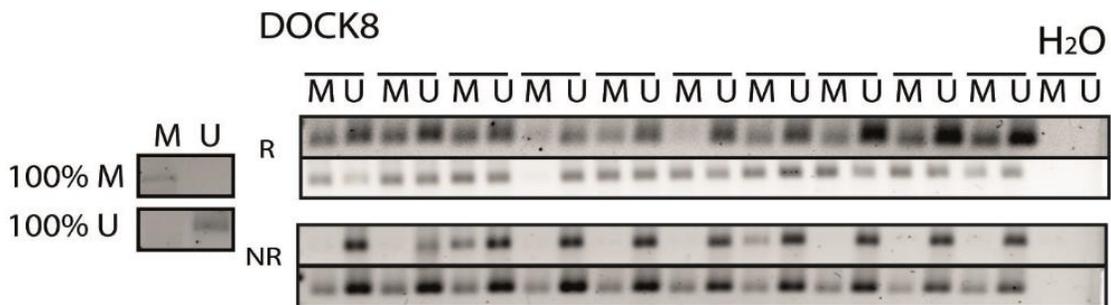


Figura 24. MSP DOCK8. Ensayo de MSP para el gen BRD9, R) biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento, las acotaciones M y U corresponden a Metilado y No metilado respectivamente, en la parte derecha los controles de amplificación con DNA 100% metilado y DNA 100% no metilado.

Comparamos el porcentaje de pacientes con el estado de metilación de las regiones promotoras de BRD9, CTU1 y DOCK8 (Tabla 6) y podemos ver claramente que 100% de los pacientes R tienen metilada la región promotora de BRD9 y desmetilada la región promotora del gen CTU1. Más del noventa por ciento de los pacientes NR tienen la región de estos mismos genes hemimetilada. El caso de DOCK8, tanto en grupo R y NR es variable la distribución de porcentajes.

Tabla 6 Relación entre metilación y pacientes. Porcentaje de pacientes y el nivel de metilación, Metilado (M), Hemimetilado (HM) y Desmetilado (U), esta representación se realizó para los genes BRD9, CTU1 y DOCK8 e los grupos R y NR.

		M	HM	U
BRD9	R	100%		
	NR		90%	10%
CTU1	R			100%
	NR		95%	5%
DOCK8	R		55%	45%
	NR			100%

LA EXPRESIÓN DE LOS GENES BRD9, CTU1 Y DOCK8 ESTA
RELACIONADA CON EL NIVEL DE METILACIÓN DE SU REGIÓN
PROMOTORA

Con el fin de determinar la expresión de estos genes candidatos para correlacionarlos con el nivel de metilación observado en la validación por MSP, se realizaron reacciones de PCR cuantitativa qPCR tomando 10 de las biopsias utilizadas para la validación de los genes candidatos, 5 de las cuales fueron de pacientes que respondieron al tratamiento y 5 de pacientes que no respondieron.

Analizando la expresión del gen BRD9 en las cohortes de pacientes con distinta respuesta (Figura 25), podemos observar que en las biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento tienen una expresión relativa mayor con una media de 0.8 comparada con el grupo de biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento el cual presento una media de 0.3.

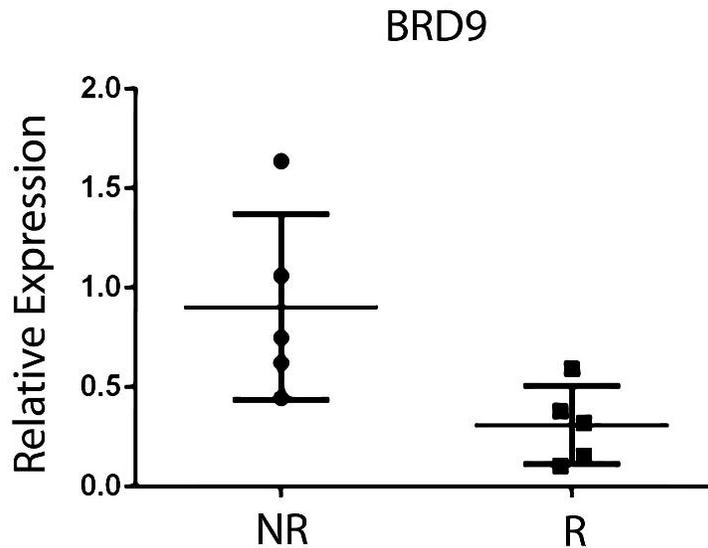


Figura 25. Expresión relativa del gen BRD9. R) Biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) Biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento. Graficados con $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A comparar el nivel de expresión relativa del gen CTU1 (Figura 26) en la cohorte de pacientes que respondieron al tratamiento es mayor, teniendo una media de

2.9. la media de la cohorte de pacientes que no respondieron al tratamiento disminuyó casi el triple, siendo solamente de 0.3.

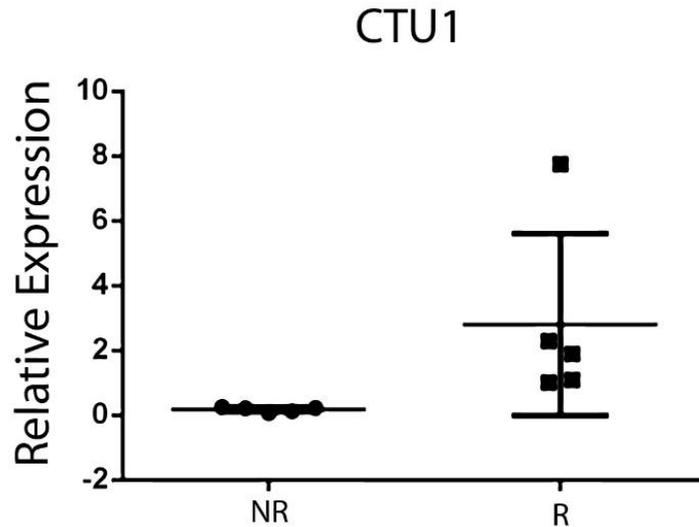


Figura 26. Expresión relativa del gen CTU1. R) Biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) Biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento. Graficados con $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En la figura 27 podemos observar el análisis de la expresión del gen DOCK8, la expresión de este gen pasa de tener una media de 1.1 en la cohorte de pacientes que no respondió al tratamiento, a disminuir a 0.9 en la cohorte de pacientes que respondió al tratamiento.

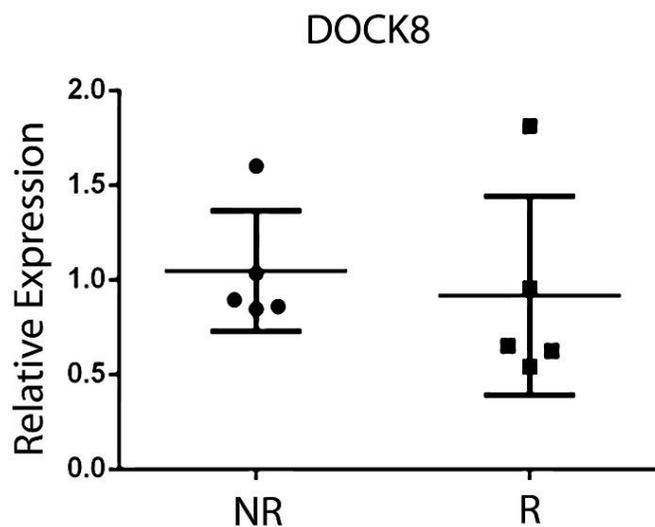


Figura 27. Expresión relativa del gen DOCK8. R) Biopsias de pacientes que respondieron al tratamiento NR) Biopsias de pacientes que no respondieron al tratamiento. Graficados con $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

DISCUSIÓN

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas que ha sido más estudiada en la última década debido a que tiene un papel crucial en los eventos de regulación transcripcional (Razin & Cedar, 1991). En este trabajo nos enfocamos en la búsqueda de genes que pudieran fungir como biomarcadores de respuesta al tratamiento en cáncer de cérvix basándonos en patrones de metilación encontrados en biopsias de pacientes, para lograrlo nos valimos de una serie de herramientas metodológicas. Lo primero que se realizamos fue el análisis de un microarreglo específico para metilación de DNA.

Sabemos que las células en tejidos tumorales tienen patrones de expresión aberrantes, en el caso del CC esta expresión puede deberse a factores como mutaciones o la presencia de oncoproteínas virales expresadas mediante una infección por HPV (Hagemann et al., 2007). Sin embargo, sabemos también que la expresión de un gran número de genes está altamente regulada por la metilación de sus regiones promotoras (Razin & Cedar, 1991). No es poco común que alteraciones o defectos en este mecanismo estén presentes en un gran número de enfermedades y desordenes celulares, incluido el cáncer (Watts et al., 2008). Es de crucial importancia tener una perspectiva global del nivel de metilación en tumores, analizando el microarreglo específico para metilación que generamos, claramente distinguimos patrones de metilación característicos al comparar el perfil de los pacientes R con el de los pacientes NR, resultados similares se han podido observar en estudios previos en donde se ha comparado el nivel de metilación en líneas celulares, tumores y tejido adyacente libre de displasia en cérvix (Lai et al., 2008). Sin embargo, existen pocos estudios enfocados en relacionar los patrones de metilación con la respuesta al tratamiento en cáncer de cérvix.

Basándonos en la diferencia observada en los perfiles de metilación de dos cohortes, asumimos que hay genes que por el nivel de metilación de su región

promotora pueden ser considerados como indicadores de un estado biológico, es decir como biomarcadores (Strimbu & Tavel, 2010). Estos biomarcadores que son producto de una metilación aberrante, relacionando la hipermetilación e hipometilación de regiones promotoras con cambios de expresión génica y asociando este evento a la respuesta de los pacientes a las terapias en otros tipos de cáncer (Kurkjian, Kummar, & Murgu, 2008b), ya que este tipo patrones de metilación aberrante participan en el reordenamientos de la cromatina y en la inestabilidad genómica (Watts et al., 2008).

Comparando el B-Value de los genes *BRD9*, *CTU1* y *DOCK8* (Figura 19) corroboramos que presentan una correlación inversa en el nivel de metilación entre pacientes R y pacientes NR.

El papel de estos genes en la dinámica celular es; la regulación de modificaciones en la estructura de cromatina, intercambio de nucleótidos de guanina para cascadas de señalización y modificación de tRNA's.

La proteína codificada por el gen *BRD9* funciona como sensor epigenético reconociendo residuos de histonas acetiladas facilitando la transcripción. Hemos mencionado anteriormente que alteraciones en la interacción BRD9-Histona están relacionadas con el desarrollo del cáncer (Dhalluin et al., 1999). Nuestros resultados muestran que la región promotora de este gen está metilada en pacientes R, mientras que en pacientes NR se encuentra hemimetilada (Figura 22). Al comparar estos datos con la expresión relativa de este gen, podemos ver claramente que el estado de metilación está regulando la expresión de *BRD9* (Figura 25). Se ha reportado que la sobreexpresión de *BRD9* es una dependencia funcional en sarcomas sinoviales, llevando a la reestructuración de la cromatina a su estado activo promoviendo la transcripción de oncogenes (Brien et al., 2018).

Por otra parte, la proteína codificada por el gen *CTU1*, en conjunción con la proteína *Elp3*, se encarga de realizar modificaciones en tRNAs, para mantener la especificidad del anticodón y garantizar la traducción fidedigna (Delaunay et al., 2016), además se ha demostrado que el complejo en el que participa esta proteína es requerido para mantener la estabilidad en el genoma (Dewez et al., 2008). Curiosamente se ha reportado que *CTU1* y *Elp3* se encuentran sobreexpresados en cáncer de mama, estos estudios corroboran que dicha sobreexpresión conduce a las células tumorales a un fenotipo invasivo y un mal pronóstico (Delaunay et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados muestran que *CTU1* se encuentra desmetilado en pacientes R y hemimetilado en pacientes NR (Figura 23), lo cual

concuerda con nuestro análisis de expresión relativa de dicho gen (Figura 26) en muestras de pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada.

Debemos tener en cuenta que la expresión génica difiere de manera específica en distintos tipos tisulares (Ardlie et al., 2015), nuestro grupo de trabajo ha demostrado que, algunas moléculas como es el caso del microRNA miR-26 actúan como oncogénicas en tejidos de colon (López-Urrutia et al., 2017), sin embargo, existen estudios que corroboran la acción de este microRNA como supresor tumoral en un tipo tisular distinto como es el hepatocelular (Yang et al., 2013) o en tejido nasofaríngeo (Lu et al., 2011). De acuerdo a esta evidencia podemos decir que el papel de la expresión de *CTU1* puede ser variable en distintos tipos de tejido.

Por su parte, la proteína codificada por el gen *DOCK8* interactúa con GTPasas y componentes de las redes de señalización intracelular, es un factor sumamente importante durante la respuesta inmunitaria para la migración de células dendríticas (Su, Jing, Angelus, & Freeman, 2019). Nuestros resultados muestran que en al menos la mitad de los pacientes NR la región promotora de *DOCK8* se encuentra desmetilada, mientras que en 17 biopsias de pacientes R esta región se encontró hemimetilada. En los resultados que obtuvimos al analizar la expresión de este gen en ambas cohortes podemos observar que, si bien el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ graficado de pacientes NR es 0.3 veces mayor al graficado en R, la diferencia no es significativa. El papel de *DOCK8* en cáncer hasta el momento es controversial, la pérdida de función de este gen está relacionada con enfermedades inmunitarias autosómicas recesivas (Su, 2010), en el año 2009 se reportó que en cáncer hepatocelular este gen se encontraba subexpresado (Saelee et al., 2009), sin embargo, seis años después se caracterizó la unión de *DOCK8* con la GTPasa Rac1, la activación de Rac1 por medio del intercambio de nucleótidos de guanina de *DOCK8* estimula cambios en la actina y membrana celular, lo que conlleva a la motilidad celular y la invasión (Wang et al., 2015). Estos resultados nos revelan que la expresión de este gen tiene un papel crucial en el desarrollo tumoral, podemos relacionar la desmetilación de la región promotora de este gen con la no respuesta al tratamiento.

Un aspecto clave que se debe tomar en cuenta es la heterogeneidad tumoral, esto quiere decir que en un tumor existen diversas subpoblaciones celulares, esta característica tumoral tiene una implicación crucial en la comprensión del comportamiento de un tumor (Welch, 2016). Si bien, los eventos epigenéticos no son los que ocasionan directamente esta heterogeneidad, los cambios de expresión génica que estos causan juegan un papel crucial en el cambio de la dinámica

celular, que puede ocasionar desde cambios en la plasticidad celular, hasta resistencia a fármacos (Marusyk & Polyak, 2010).

CONCLUSIONES

En este trabajo enfocado a encontrar posibles biomarcadores de respuesta a tratamiento en pacientes con cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada, hemos encontrado diferencias interesantes al comparar perfiles de metilación de biopsias de pacientes que respondieron y pacientes que no respondieron a la quimio-radioterapia concomitante. Basados en nuestros resultados nosotros concluimos que el perfil global de metilación de DNA es distintivo en pacientes que respondieron y que no respondieron al tratamiento.

Los genes que nosotros seleccionamos para su validación como posibles biomarcadores participan en mecanismos que son cruciales para mantener la homeostasis celular.

El nivel de metilación de la región promotora de los genes BRD9 y CTU1 puede ser tomados como biomarcadores de respuesta a tratamiento en cáncer de cérvix en etapa localmente avanzada.

El papel de DOCK8 como biomarcador podemos atribuirlo al nivel de metilación en su región promotora aun cuando la expresión de este no este directamente ligada a este fenómeno. la sobre expresión de este gen está relacionada con un mal pronóstico de respuesta a tratamiento.

REFERENCIAS

- Ardlie, K. G., Deluca, D. S., Segre, A. V., Sullivan, T. J., Young, T. R., Gelfand, E. T., ... Dermitzakis, E. T. (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*, *348*(6235), 648–660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, *21*(3), 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barabas, K., Milner, R., Lurie, D., & Adin, C. (2008). Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Veterinary and Comparative Oncology*, *6*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00142.x>
- Bartosch, C., Lopes, J. M., & Jerónimo, C. (2017). Epigenetics in endometrial carcinogenesis – part 1: DNA methylation. *Epigenomics*, epi-2016-0166. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0166>
- Baylin, S. B., & Ohm, J. E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer*, *6*(2), 107–116. <https://doi.org/10.1038/nrc1799>
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, *125*(2), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bogdanović, O., & Veenstra, G. J. C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, *118*(5), 549–565. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0221-9>
- Boyer, S. N., Wazer, D. E., & Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*, *56*(20), 4620–4624. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840974>
- Branco, M. R., Ficz, G., & Reik, W. (2012). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature Reviews Genetics*, *13*(1), 7–13. <https://doi.org/10.1038/nrg3080>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018a). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A.

- (2018b). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brien, G. L., Remillard, D., Shi, J., Hemming, M. L., Chabon, J., Wynne, K., ... Armstrong, S. A. (2018). Targeted degradation of BRD9 reverses oncogenic gene expression in synovial sarcoma. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.41305>
- Cao, J. (2014). The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biological Procedures Online*, 16, 11. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-16-11>
- Carlson, R. W., Allred, D. C., Anderson, B. O., Burstein, H. J., Carter, W. B., Edge, S. B., ... NCCN Breast Cancer Clinical Practice Guidelines Panel. (2009). Breast cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 7(2), 122–192. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200416>
- Carreras Collado, R., Xercavins Montosa, J., & Checa Vizcaíno, M. A. (2007). *Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero*. Retrieved from <http://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4223/Virus-del-Papiloma-Humano-y-Cancer-de-Cuello-de-Ptero.html>
- Chen, Y.-C., Huang, R.-L., Huang, Y.-K., Liao, Y.-P., Su, P.-H., Wang, H.-C., ... Lai, H.-C. (2014). Methylomics analysis identifies epigenetically silenced genes and implies an activation of β -catenin signaling in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 135(1), 117–127. <https://doi.org/10.1002/ijc.28658>
- Davidovich, C., Zheng, L., Goodrich, K. J., & Cech, T. R. (2013). Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(11), 1250–1257. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2679>
- Dawson, M. A., Kouzarides, T., Wang, E., Rappaport, A. R., Herrmann, H., Sison, E. A., ... al., et. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- Delaunay, S., Rapino, F., Tharun, L., Zhou, Z., Heukamp, L., Termathe, M., ... Close, P. (2016). Elp3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 213(11), 2503–2523. <https://doi.org/10.1084/jem.20160397>
- Delpu, Y., Cordelier, P., Cho, W. C., & Torrisani, J. (2013). DNA methylation and cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 15029–15058. <https://doi.org/10.3390/ijms140715029>
- Dewez, M., Bauer, F., Dieu, M., Raes, M., Vandenhoute, J., & Hermand, D. (2008). The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(14), 5459–5464. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709404105>

- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., & Zhou, M. M. (1999). ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments for the bromodomain of the histone acetyltransferase P/CAF. *Journal of Biomolecular NMR*, *14*(3), 291–292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481282>
- DiSaia, P. J., Creasman, W. T., Mannel, R. S., McMeekin, D. S., & Mutch, D. G. (n.d.). *Oncología ginecológica clínica + acceso web*. Retrieved from <https://tienda.elsevier.es/oncologia-ginecologica-clinica-acceso-web-9788491133087.html>
- Du, Q., Luu, P.-L., Stirzaker, C., & Clark, S. J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*, *7*(6), 1051–1073. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>
- Dueñas-González, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., & Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*, *4*(1), 38. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-4-38>
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, *429*(6990), 457–463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
- Eisenhauer, E. A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L. H., Sargent, D., Ford, R., ... Verweij, J. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*, *45*(2), 228–247. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2008.10.026>
- Esquivel, G. M., Coronel Martínez, J. A., Zermeño, A. A., Cantú De León, D. F., Flores Alatríste, D., Rojo, A. O., ... Herrera Gómez, Á. (n.d.). *Cáncer Cervicouterino*. Retrieved from <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1327324533.pdf>
- Fauci, A. S., Harrison, T. R., & Harrison, T. R. (2009). *Harrison's manual of medicine*. McGraw-Hill Medical.
- Filippakopoulos, P., Picaud, S., Mangos, M., Keates, T., Lambert, J.-P., Barsyte-Lovejoy, D., ... Knapp, S. (2012). Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell*, *149*(1), 214–231. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.013>
- Finlay, G. J. (1993). Genetics, molecular biology and colorectal cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *290*(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90027-D](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90027-D)
- Gontan, C., Jonkers, I., & Gribnau, J. (2011). Long Noncoding RNAs and X Chromosome Inactivation. In *Progress in molecular and subcellular biology* (Vol. 51, pp. 43–64). https://doi.org/10.1007/978-3-642-16502-3_3
- Hagemann, T., Bozanovic, T., Hooper, S., Ljubic, A., Slettenaar, V., Wilson, J. L., ... Van Trappen, P. (2007). Molecular profiling of cervical cancer progression.

- British Journal of Cancer*, 96, 321–328. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603543>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/J.JCRPR.2017.07.001>
- Herranz, M., & Esteller, M. (2005). CpG Island Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Human Cancer. In *DNA Methylation and Cancer Therapy* (pp. 69–84). https://doi.org/10.1007/0-387-27443-X_6
- Hildesheim, A., Schiffman, M. H., Gravitt, P. E., Glass, A. G., Greer, C. E., Zhang, T., ... Sherman, M. E. (1994). Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(2), 235–240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106758>
- Huang, H., Wang, Y., Li, Q., Fei, X., Ma, H., & Hu, R. (2019). miR-140-3p functions as a tumor suppressor in squamous cell lung cancer by regulating BRD9. *Cancer Letters*, 446, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.007>
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - 'A rough guide.' *FEBS Letters*, 583(11), 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- International Agency for Research on Cancer. (2007). *Human papillomaviruses*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK321760/>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kraus, T. F. J., Globisch, D., Wagner, M., Eigenbrod, S., Widmann, D., Münzel, M., ... Kretzschmar, H. A. (2012). Low values of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), the “sixth base,” are associated with anaplasia in human brain tumors. *International Journal of Cancer*, 131(7), 1577–1590. <https://doi.org/10.1002/ijc.27429>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science (New York, N. Y.)*, 324(5929), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Kurkjian, C., Kummar, S., & Murgo, A. J. (2008a). DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Current Problems in Cancer*, 32(5), 187–235. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2008.08.002>
- Kurkjian, C., Kummar, S., & Murgo, A. J. (2008b). DNA methylation: its role in cancer development and therapy. *Current Problems in Cancer*, 32(5), 187–235. <https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2008.08.002>
- Lai, H.-C., Lin, Y.-W., Huang, T. H. M., Yan, P., Huang, R.-L., Wang, H.-C., ... Yu,

- M.-H. (2008). Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 123(1), 161–167. <https://doi.org/10.1002/ijc.23519>
- Li, L.-C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCR. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 18(11), 1427–1431. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112>
- López-Urrutia, E., Coronel-Hernández, J., García-Castillo, V., Contreras-Romero, C., Martínez-Gutierrez, A., Estrada-Galicia, D., ... Pérez-Plasencia, C. (2017). MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer. *Tumor Biology*, 39(4), 101042831769594. <https://doi.org/10.1177/1010428317695945>
- López Saavedra, A., & Lizano Soberón, M. (n.d.). *Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina Resumen**. Retrieved from <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1172193073.pdf>
- Lorusso, D., Petrelli, F., Coinu, A., Raspagliesi, F., & Barni, S. (2014). A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 133(1), 117–123. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2014.01.042>
- Lu, J., He, M.-L., Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Dong, Q., ... Li, X.-P. (2011). MiR-26a Inhibits Cell Growth and Tumorigenesis of Nasopharyngeal Carcinoma through Repression of EZH2. *Cancer Research*, 71(1), 225–233. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1850>
- Maier, S., Dahlstroem, C., Haefliger, C., Plum, A., & Piepenbrock, C. (2005). Identifying DNA Methylation Biomarkers of Cancer Drug Response. *American Journal of Pharmacogenomics*, 5(4), 223–232. <https://doi.org/10.2165/00129785-200505040-00003>
- Mantovani, F., & Banks, L. (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 20(54), 7874–7887. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204869>
- Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2009.11.002>
- Mikeska, T., Bock, C., Do, H., & Dobrovic, A. (2012). DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 12(5), 473–487. <https://doi.org/10.1586/erm.12.45>
- Ohara, K., Arai, E., Takahashi, Y., Ito, N., Shibuya, A., Tsuta, K., ... Kanai, Y. (2017). Genes involved in development and differentiation are commonly methylated in cancers derived from multiple organs: A single-institutional methylome analysis using 1007 tissue specimens. *Carcinogenesis*, bgw209. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw209>

- Pecorelli, S., Zigliani, L., & Odicino, F. (2009). Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, *105*(2), 107–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2009.02.009>
- Pfister, S., Schlaeger, C., Mendrzyk, F., Wittmann, A., Benner, A., Kulozik, A., ... Lichter, P. (2007). Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medulloblastoma. *Nucleic Acids Research*, *35*(7), 51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm094>
- Rasmussen, K. D., & Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes & Development*, *30*(7), 733–750. <https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>
- Razin, A., & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, *55*(3), 451–458. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943996>
- Rose, P. G., Bundy, B. N., Watkins, E. B., Thigpen, J. T., Deppe, G., Maiman, M. A., ... Insalaco, S. (1999). Concurrent Cisplatin-Based Radiotherapy and Chemotherapy for Locally Advanced Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine*, *340*(15), 1144–1153. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904153401502>
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, *53*(3), 441–442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>
- Saelee, P., Wongkham, S., Puapairoj, A., Khuntikeo, N., Petmitr, S., Chariyalertsak, S., ... Karalak, A. (n.d.). Novel PNLIPRP3 and DOCK8 gene expression and prognostic implications of DNA loss on chromosome 10q25.3 in hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *10*(3), 501–506. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19640199>
- Saslow, D., Solomon, D., Lawson, H. W., Killackey, M., Kulasingam, S. L., Cain, J., ... Myers, E. R. (2012). American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *62*(3), 147–172. <https://doi.org/10.3322/caac.21139>
- Steel, G. G., & Peckham, M. J. (1979). Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *5*(1), 85–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/422420>
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, *5*(6), 463–466. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>
- Su, H. C. (2010). Deducator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *10*(6), 515–520.

<https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32833fd718>

- Su, H. C., Jing, H., Angelus, P., & Freeman, A. F. (2019). Insights into immunity from clinical and basic science studies of DOCK8 immunodeficiency syndrome. *Immunological Reviews*, 287(1), 9–19. <https://doi.org/10.1111/imr.12723>
- Waggoner, S. E. (2003). Cervical cancer. *The Lancet*, 361(9376), 2217–2225. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13778-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13778-6)
- Wang, S.-J., Cui, H.-Y., Liu, Y.-M., Zhao, P., Zhang, Y., Fu, Z.-G., ... Jiang, J.-L. (2015). CD147 promotes Src-dependent activation of Rac1 signaling through STAT3/DOCK8 during the motility of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*, 6(1), 243–257. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2801>
- Watts, G. S., Futscher, B. W., Holtan, N., Degeest, K., Domann, F. E., & Rose, S. L. (2008). DNA methylation changes in ovarian cancer are cumulative with disease progression and identify tumor stage. *BMC Medical Genomics*, 1, 47. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-47>
- Welch, D. R. (2016). Tumor Heterogeneity--A 'Contemporary Concept Founded on Historical Insights and Predictions. *Cancer Research*, 76(1), 4–6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3024>
- Worm, J., Kirkin, A. F., Dzhandzhugazyan, K. N., & Guldberg, P. (2001). Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39990–40000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103181200>
- Yang, X., Liang, L., Zhang, X.-F., Jia, H.-L., Qin, Y., Zhu, X.-C., ... Qin, L.-X. (2013). MicroRNA-26a suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by targeting interleukin-6-Stat3 pathway. *Hepatology*, 58(1), 158–170. <https://doi.org/10.1002/hep.26305>
- Yeo-Teh, N., Ito, Y., & Jha, S. (2018). High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1706. <https://doi.org/10.3390/ijms19061706>
- Zhang, Y.-J., Wu, H.-C., Shen, J., Ahsan, H., Tsai, W. Y., Yang, H.-I., ... Santella, R. M. (2007). Predicting Hepatocellular Carcinoma by Detection of Aberrant Promoter Methylation in Serum DNA. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2378–2384. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1900>
- Ziller, M. J., Gu, H., Muller, F., Donaghey, J., Tsai, L. T.-Y., Kohlbacher, O., ... Meissner, A. (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature*, 500(7463), 477–481. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature12433>
- zur Hausen, H. (1999). Papillomaviruses in Human Cancers. *Proceedings of the*

Association of American Physicians, 111(6), 581–587.
<https://doi.org/10.1046/j.1525-1381.1999.99723.x>