



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“POLIMORFISMOS DE LA DNMT3B Y SU  
ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE LESIONES  
PRECANCEROSAS Y CÁNCER CÉRVICO UTERINO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:  
**RUBÉN GARCÍA AGUILAR**

DIRECTOR DE TESIS: M en C. DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO

CHILPANCINGO, GRO., JUNIO DE 2009.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**APROBACIÓN DE TESIS**

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 3 días del mes de octubre de dos mil ocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Polimorfismos de la DNMT3B y su asociación con el desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer cérvico uterino”, presentada por el alumno Rubén García Aguilar, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

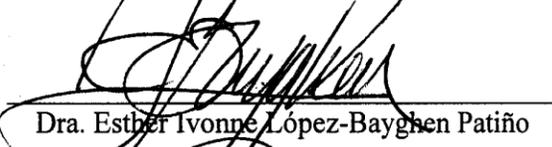
El Comité Tutorial

  
M en C. Daniel Hernández Sotelo  
Dirección de tesis

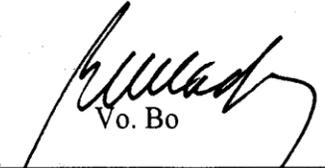
  
M en C. Ma. Elena Moreno Godínez

  
Dra. Berenice Illades Aguiar

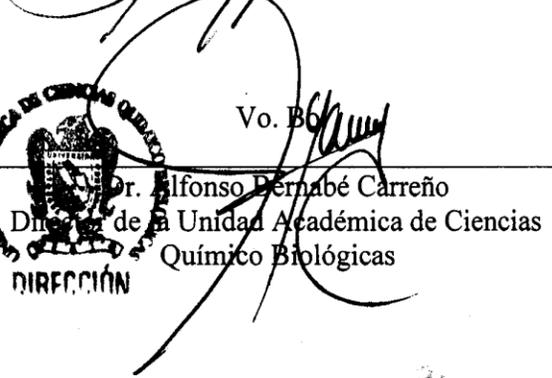
  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

  
Dra. Esther Ivonne López-Baygán Patiño

Vo. Bo

  
Dra. Berenice Illades Aguiar  
Coordinadora de la Maestría en Ciencias  
Biomédicas

Vo. Bo

  
Dr. Alfonso Bernabé Carreño  
Director de la Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero, México.

**Bajo la dirección de:**

M en C. Daniel Hernández Sotelo.

**La asesoría de:**

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Esther I. López-Bayghen Patiño

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

M en C. Ma. Elena Moreno Godínez

Con la colaboración de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño. Departamento de Genética y Biología Molecular. Laboratorio 5 IPN-CINVESTAV, México D.F.

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento otorgado por FOMIX-GUERRERO. Clave: GUE-2002-C01-6523.

Durante el periodo en que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Rubén García Aguilar recibió beca otorgada por Movilidad Santander Universia, Banco Santander Serfin en el periodo: Agosto-Enero 2008, a quien agradece el otorgamiento de dicha beca.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme disfrutar de este regalo tan maravilloso que es la vida y por todas las bendiciones que inmerecidamente he recibido durante todo este tiempo.

Al M en C. Daniel Hernández Sotelo, por la confianza, paciencia y conocimiento que me brindo durante el transcurso de este trabajo. Por las invitaciones a la reflexión y análisis de mi desempeño durante maestría. Por ser el amigo que tiene respuestas a mis preguntas.

A mi comité de sinodales Dra. Berenice Illades Aguiar, Dra. Esther I. López-Bayghen Patiño, Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero y M en C. Ma. Elena Moreno Godínez, por su apoyo, tiempo y aportaciones que incondicionalmente me brindaron.

A mis padres Fortunato García Ortega e Isis Aguilar Aguilar, su amor, esfuerzo y ejemplo son la fuente de inspiración para cumplir mis objetivos.

A mis hermanos Ulises, Isis y David, gracias por compartir cada momento de sus vidas conmigo. Los quiero mucho.

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	4
<b>III. RESULTADOS</b>	6
<b>IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	13
<b>V. REFERENCIAS</b>	20

## RESUMEN

**Antecedentes.** Factores genéticos y epigenéticos son importantes para el desarrollo de cáncer cérvico uterino (CaCU). La DNA metiltransferasa 3B (DNMT3B) juega un papel crucial en la carcinogénesis, su actividad de metilasa de *ново* puede llevar al silenciamiento de genes supresores de tumor. Variantes polimórficas en el gen de la DNMT3B pueden influir en su actividad, modulando así la susceptibilidad a CaCU.

**Objetivos.** Determinar la presencia de los polimorfismos A204S, E368K, -579G>T y 46359C>T de la DNMT3B y su asociación con el desarrollo de lesiones escamosas intraepiteliales de bajo y alto grado (LEIBG-LEIAG) y CaCU. **Metodología.** Se realizó un estudio de casos y controles, a partir de 330 muestras de DNA de mujeres guerrerenses. La genotipificación de los polimorfismos se hizo mediante PCR-RFLPs. Se calcularon frecuencias genotípicas y las asociaciones se evaluaron mediante razón de momios (RM), a intervalos de confianza (IC) al 95%. **Resultados.**

Todas las muestras analizadas para los polimorfismos A204S y E368K de la DNMT3B presentaron el genotipo silvestre GG. Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo 46359C>T fueron las siguientes: genotipo CT con 55.5%, TT con 34.5%, CC 10%. Para el polimorfismo -579G>T fueron: genotipo TT 58.2%, GT 34.2%, y GG 7.6%. El genotipo homocigoto GG -579 se mostró como factor de riesgo para el desarrollo de LEIBG y LEIAG (RM: 2.79, IC: 0.68-9.85 y RM: 1.67, IC: 0.27-7.13); el genotipo CT del polimorfismo 46359C>T es el único que mostró asociación significativa con el desarrollo CaCU (RM: 8.76, IC: 1.3-67.91).

**Conclusión.** El polimorfismo -579G>T de la DNMT3B no está asociado significativamente con el desarrollo de lesiones precancerosas y CaCU. Mujeres con un genotipo CT del polimorfismo 46359C>T tienen 8.76 veces más riesgo de desarrollar CaCU comparadas con las portadoras del genotipo CC.

Palabras clave. Lesiones precancerosas, CaCU, DNMT3B, Polimorfismos.

## ABSTRACT

**Background.** Epigenetic and genetic factors are important for the development of cervical cancer (CC). DNMT3B plays a crucial role in carcinogenesis, its *novo* metilase activity can lead to silencing of tumor suppressor genes. Polymorphic variants in the gene for DNMT3B can influence their activity, thus modulating the susceptibility to CC. **Aim.** To determine the frequency of polymorphisms A204S, E368K, -579G>T and 46359C>T of DNMT3B and its association with development of low and high grade squamous intraepithelial lesions (LGSIL-HGSIL) and CC. **Methods.** We performed a case-control study, based on 330 samples of DNA. The genotyping of polymorphisms was made by PCR-RFLPs. Genotypic frequencies were calculated, and the associations were evaluated by odds ratios (OR), 95% confidence intervals (IC). **Results.** All samples were analyzed for polymorphisms A204S and E368K of DNMT3B presented the wild GG genotype. The genotypic frequencies for the 46359C>T polymorphism were as follows: CT genotype with 55.5%, 34.5% TT and CC 10%. For the polymorphism -579G> T were: TT genotype 58.2%, 34.2% GT, GG and 7.6%. The GG genotype homozygous -579 expressed as a risk factor for the development of LGSIL and HGSIL (OR: 2.79, IC: 0.68-9.85 and OR: 1.67, IC: 0.27-7.13), the CT genotype polymorphism 46359C>T is the only one who showed association with statistical significance with development CC (OR: 8.76, IC: 1.3-67.91). **Conclusion.** The polymorphism -579G>T of the DNMT3B is not significantly associated with the development of cancer and its precursor lesions. Women with the CT genotype the polymorphism 46359T have 8.76 times greater risk of developing cancer compared with those carrying the CC genotype.

Keywords: CC, precursor lesions, polymorphism, DNMT3B.

## I. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU. Aunque la infección por VPH de alto riesgo se ha encontrado en el 99.7% de los casos de CaCU a nivel mundial y más del 50% de las mujeres sexualmente activas han sido infectadas con VPH alguna vez en su vida, no obstante, menos del 5% de las mujeres con VPH desarrollaran CaCU<sup>1-4</sup>. Lo que sugiere que la presencia del VPH en el cérvix no equivale al desarrollo de CaCU. De hecho, estudios epidemiológicos y ensayos *in vitro*, han demostrado que otros co-factores genéticos, epigenéticos y ambientales favorecen el desarrollo de esta malignidad<sup>3,5,6</sup>.

La metilación es una de las principales modificaciones epigenéticas asociada con el desarrollo de cáncer<sup>7</sup>. De forma normal, la metilación del DNA regula la estabilidad cromosomal, la integridad del genoma, la expresión de genes, la impronta genómica, el silenciamiento de transposones y la inactivación del cromosoma X en las mujeres<sup>8,9</sup>. La metilación es mediada por las DNMTs, existen 3 tipos principales de estas enzimas en células de mamíferos, DNMT1, DNMT3A y DNMT3B<sup>10,11</sup>. La DNMT1 es requerida para mantener los patrones de metilación, las DNMT3A y DNMT3B son responsables de la metilación *de novo*<sup>12,13</sup>. La sobreexpresión de la DNMT3B ha sido observada en varios tipos de tumores<sup>14,15</sup>. Algunos cánceres humanos incluyendo el CaCU, presentan hipometilación global e hipermetilación localizada de citosinas adyacentes a guaninas (CpGs)<sup>6,16</sup>. La metilación aberrante de islas CpGs de regiones promotoras puede jugar un papel importante en la carcinogénesis debido a que puede generar el silenciamiento de genes supresores de tumor y genes reparadores del DNA<sup>17,18</sup>. Además, la hipermetilación *de novo* facilita mutación de genes a través de la desaminación de 5-metil citosina a timina<sup>18</sup>.

El gen de la DNMT3B está localizado en el cromosoma 20q11.2 y hasta el momento se han reportado 5 variantes polimórficas. De las cuales dos se localizan en la región codificante (A204S y E368K) y 3 variantes en la región promotora (-283T>C, -579G>T y 46359C>T). Aunque hay pocos estudios sobre el efecto funcional de estos

polimorfismos, hay indicios de que las variantes pueden alterar la expresión, función catalítica y la especificidad de metilación de la DNMT3B<sup>19</sup>.

La primera evidencia de que el polimorfismo de transición C46359TC>T de la región promotora de DNMT3B puede estar asociado con cáncer fue encontrada en pacientes con cáncer de pulmón. En el cual los portadores del alelo T, particularmente heterocigotos CT, tenían un aumento significativo de desarrollar cáncer (RM: 2.13, IC:1.47-3.08)<sup>20</sup>. Además en análisis *in vitro*, este genotipo polimórfico confiere un aumento del 30% en la actividad del promotor. Aunque el mecanismo para esta asociación no es claro, se propuso que la variante T puede aumentar la expresión de la DNMT3B y de este modo provocar el silenciamiento epigenético de algunos genes supresores de tumor<sup>20</sup>. En cáncer de mama, la combinación de los genotipos C/T y C/C han mostrado, significativamente, estar asociados con un alto riesgo de desarrollar cáncer comparados con el genotipo T/T (RM: 1.51; IC:1.01-2.25)<sup>21</sup>.

Un estudio en pacientes con cáncer de pulmón encontró que individuos con por lo menos un alelo G en la posición -579 del promotor del gen de la DNMT3B, tienen menor riesgo de desarrollar adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas de pulmón comparados con los portadores del genotipo TT (RM: 0.47; IC: 0.28-0.81)<sup>19</sup>. El análisis *in vitro* del promotor del gen de DNMT3B reveló que el polimorfismo -579G>T no provoca cambios en la actividad transcripcional<sup>19</sup>. La actividad alterada de la DNMT3B contribuye a la generación de metilación aberrante en cáncer, por lo que puede estar asociado con el desarrollo de lesiones precancerosas y CaCU. Sin embargo, la asociación entre los SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) de la DNMT3B y el riesgo de desarrollar LEIBG, LEIAG y CaCU no ha sido estudiada. Además, la frecuencia de los SNPs de la DNMT3B en población mexicana no ha sido documentada hasta ahora.

En este estudio se determinó la presencia de los polimorfismos A204S, E368K, 579G>T y 46359C>T de la DNMT3B y su asociación con el desarrollo de LEIBG, LEIAG y CaCU en un estudio de casos y controles en una población guerrerense. La asociación entre los SNPs de la DNMT3B y CaCU podría ser de utilidad para la identificación temprana de individuos susceptibles a desarrollar lesiones precancerosas y CaCU.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

**Población de estudio.** Este estudio de casos y controles se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la UAG. Se seleccionaron 320 muestras de DNA de mujeres que asistieron al Instituto Estatal de Cancerología de Acapulco Guerrero, de mayo de 1997 a diciembre 2003. Las 330 muestras se distribuyeron de la siguiente manera: 130 casos de los cuales 30 muestras fueron de mujeres con diagnóstico histopatológico de LEIBG, 30 con LEIAG y 70 con CaCU. Además 200 controles de mujeres con diagnóstico de citología cervical normal. Todas las muestras que se incluyeron en el estudio tienen diagnóstico histológico y citológico (en su caso) y diagnóstico de VPH por PCR/RFLP con los iniciadores MY09, MY11 y/o GP5+/GP6+.

**Genotipificación.** Los polimorfismos A204S, E368K, -579G>T y 46359C>T de la DNMT3B se genotipificaron por PCR-RFLPs. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 50  $\mu$ l con buffer 10X para PCR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), aproximadamente 200 ng de DNA genómico, iniciadores a 10  $\mu$ M,  $MgCl_2$  a 50  $\mu$ M, dNTPs al 10  $\mu$ M y 1.25 U de Taq DNA polimerasa recombinante (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos de: 30 s a 95°C, 30 s a 57.6°C para A204S, 30 s a 61.8°C para E368K, 30 s a 52°C para -579G>T y 30 s a 67°C para 46359C>T, posterior al alineamiento 30 s a 72°C y una extensión final a 72°C por 10min. Posteriormente los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2.5%, teñidos con bromuro de etidio [0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l] y visualizados bajo luz UV.

Los iniciadores usados para la amplificación de cada región polimórfica se diseñaron en basé la secuencia NT\_028392 de GenBank. El polimorfismo A204S fue determinado usando los siguientes iniciadores: 5'CGACCTCACAGACGACACAG-3' y 5'GTTCAGGGTCCTCAGTCACC-3'. El producto de PCR de 198 pb fue digerido con la enzima *Mwo*I (New England, BioLabs). El alelo polimórfico T se identifica por la presencia de una sola banda de 198 pb, y el alelo silvestre G es identificado por dos bandas, 68 y 130 pb. El E368K fue determinado usando los siguientes

iniciadores: 5´CTAGGGTGCGAGCTGGCAAGACCTT-3´ y 5´GCAAGAAAGTGGCCGGGGAA-3´. El producto de PCR de 336 pb fue digerido con la enzima *Bst*NI (New England, BioLabs). El alelo polimórfico A se identifica por una sola banda de 336 pb, y el alelo silvestre G es identificado por tres bandas, 37, 102 y 197 pb). Para el polimorfismo -579G>T usamos los siguientes iniciadores: 5´GAGGTCTCATTATGCCTAGG-3´ y 5´GGGAGCTCACCTTCTAGAAA-3´ (iniciadores diseñados por Lee *et al.*<sup>19</sup>). El producto de PCR de 225 pb fue digerido con la enzima *Pvu*II (New England, BioLabs). El alelo polimórfico se identifica por dos bandas, 93 y 132 pb, y el alelo silvestre es identificado por una banda de 225 pb. El 46359C>T fue determinado con los iniciadores: 5´TGCTGTGACAGGCAGAGCAG-3´ y 5´GGTAGCCGGGAAGTCCACGG-3´ (iniciadores diseñados por Montgomery *et al.*<sup>21</sup>). El producto de PCR de 380 pb fue digerido con la enzima *Avr*II (New England, BioLabs). El alelo polimórfico se identifica por dos bandas, 173 y 207 pb, y el alelo silvestre es identificado por una banda de 380 pb. Los productos de las restricciones se analizaron en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

**Análisis estadístico.** Se calcularon frecuencias simples para los polimorfismos y genotipo viral. Se calculó la media e intervalos de edad en casos y controles. Se determinó la asociación de los polimorfismos con lesiones precancerosas y CaCU mediante razón de momios (RM) y su significancia estadística se evaluó por IC al 95%. Finalmente para determinar la asociación de las covariables con CaCU y las lesiones precancerosas se efectuó un análisis multivariado de regresión logística.

### III. RESULTADOS

El análisis de la distribución de la edad en la población de estudio se muestra en el cuadro 1. El grupo de estudio que presentó la media de mayor edad (51.8 años) fue el grupo de casos con CaCU, con un rango de 27-89 años

**Cuadro 1. Edad promedio y rango de edad de los grupos de estudio.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>n 330</b>	<b>Media de años (DE)</b>	<b>Rango de edad</b>
<b>CONTROLES</b>			
CN	200	39.3 (8)	18-72
<b>CASOS</b>			
LEIBG	30	33.8 (11.2)	18-72
LEIAG	30	36.6 (11.9)	19-70
CaCU	70	51.8 (12.2)	27-89

**n**, número de muestras, **DE**, desviación estándar

La distribución de los genotipos de VPH en casos y controles se detalla en el cuadro 2. La infección por VPH 16 fue la más frecuente en los casos con LEIAG (33.3%) y CaCU (67.1%), mientras que el VPH 33 fue el más frecuente en los casos de LEIBG (36.7%). El 94.4% de los casos con CaCU presentó infección por VPH de alto riesgo (VPH-AR). La frecuencia de infección por VPH en los casos (LEIBG, LEIAG y CaCU) fue de 94.6%. En controles, se encontró que el 25% de las muestras analizadas presentaron infección por algún tipo de VPH, mientras el 75% no presentaron infección.

**Cuadro 2. Frecuencia de genotipos de VPH estratificada por grupo de estudio.**

Genotipos de VPH	CONTROLES	CASOS		
	CN n (%)	LEIBG n (%)	LEIAG n (%)	CaCU n (%)
VPH 6	3 (1.5)	1 (3.3)		1 (1.4)
VPH 16	3 (1.5)	3 (10)	10 (33.3)	47 (67.1)
VPH 18		1 (3.3)	3 (10)	4 (5.7)
VPH 31		2 (6.7)	4 (13.3)	1 (1.4)
VPH 33	1 (0.5)	11 (36.7)	2 (6.7)	4 (5.7)
VPH 35	1 (0.5)			
VPH 39	1 (0.5)			
VPH 45		2 (6.7)		3 (4.3)
VPH 52		1 (3.3)		
VPH 53	1 (0.5)		1 (3.3)	
VPH 56				1 (1.4)
VPH 58	4 (2)			4 (5.7)
VPH 59		1 (3.3)		1 (1.4)
VPH 67				1 (1.4)
VPH 81	2 (1)	1 (3.3)	3 (10)	
VPH X	32 (16.5)		1 (3.3)	3 (4.3)
VPH IM	1 (0.5)	4 (13.3)	2 (6.7)	
NEGATIVO	150 (75)	3 (10)	4 (13.3)	
<b>TOTAL</b>	<b>200 (100)</b>	<b>30 (100)</b>	<b>30 (100)</b>	<b>70 (100)</b>
<b>VPH alto riesgo<sup>a</sup></b>	<b>11 (5.5)</b>	<b>21 (70)</b>	<b>22 (73.3)</b>	<b>66 (94.4)</b>
<b>VPH bajo riesgo<sup>b</sup></b>	<b>5 (2.5)</b>	<b>2 (6.7)</b>	<b>3 (10)</b>	<b>1 (1.4)</b>

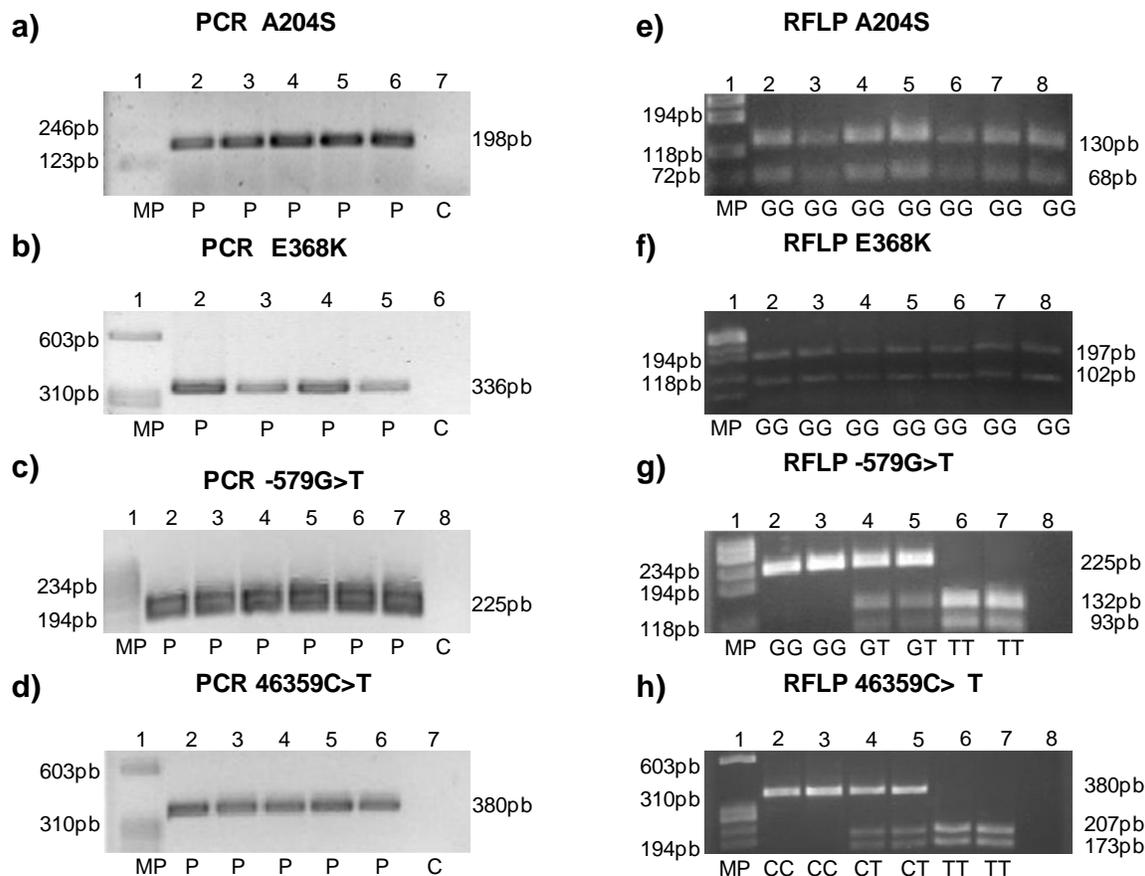
VPH X, no tipificado; VPH IM, infección múltiple

<sup>a</sup>VPH alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 67<sup>3</sup>

<sup>b</sup>VPH bajo riesgo: 6, 81<sup>3</sup>

### *Genotipificación de los polimorfismos de la DNMT3B*

La figura 1 muestra ejemplos representativos de la forma en la que se realizó la detección y genotipificación de los polimorfismos de la DNMT3B. Se amplificaron por PCR las regiones polimórficas del gen de la DNMT3B (Figura 1a, b, c y d). Los productos obtenidos fueron digeridos con enzimas de restricción para la genotipificación de cada polimorfismo como se muestran en la figura 1: e, f, g y h.



**Figura 1. Genotipificación de los polimorfismos de la DNMT3B.** (a, b, c, d), productos de PCR de los SNP's A204S, E368K, -579G>T y 46359C>T. (e, f, g, h), RFLP's de los productos de la PCR con diferentes enzimas de restricción. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles centrales: genotipos. MP: marcador de peso molecular, P: producto de PCR; C: control negativo (H<sub>2</sub>O).

Una vez estandarizadas las condiciones para la amplificación y genotipificación de los polimorfismos A204S y E368K, se analizaron 50 muestras control (25%) y 80 casos (66.7%). En ninguna de las muestras analizadas encontramos el alelo polimórfico por lo que todas mostraron el genotipo silvestre (GG).

El cuadro 3 muestra la distribución de los genotipos del polimorfismo -579G>T en la población de estudio por casos y controles. El genotipo mutante TT fue el más frecuente con 58.2%, seguido por el GT con 34.2%, y por último el silvestre GG con 7.6%. En los casos con LEIBG y LEIAG se observó una frecuencia de 56.7% para el

genotipo mutante TT. La frecuencia más baja para el genotipo silvestre GG se observó en los controles (6%).

**Cuadro 3. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo -579G>T de la DNMT3B.**

Diagnóstico	n	GG n(%)	GT n(%)	TT n(%)
<b>CONTROLES</b>				
CN	200	12 (6)	74 (37)	114 (57)
<b>CASOS</b>				
LEIBG	30	5 (16.7)	8 (26.6)	17 (56.7)
LEIAG	30	3 (10)	10 (33.3)	17 (56.7)
CaCU	70	5 (7.1)	21 (30)	44 (62.9)

n, número de muestras; **CN**, citología normal; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

El cuadro 4 describe la frecuencia de los genotipos del polimorfismo 46359C>T. El genotipo heterocigoto CT fue el más frecuente con 55.5%, seguido por el genotipo mutante TT con 34.5%, y por último el genotipo silvestre CC con 10%. Además los resultados muestran que el genotipo silvestre CC tiene la misma frecuencia (26.7%) en los casos con LEIBG y con LEIAG. La frecuencia más baja para el genotipo CC fue observada en los casos con CaCU (1.4%).

**Cuadro 4. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo 46359C>T de la DNMT3B.**

Diagnóstico	n	CC n(%)	CT n(%)	TT n(%)
<b>CONTROLES</b>				
CN	200	16 (8)	95 (47.5)	89 (44.5)
<b>CASOS</b>				
LEIBG	30	8 (26.7)	17 (56.7)	5 (16.7)
LEIAG	30	8 (26.7)	19 (63.3)	3 (10)
CaCU	70	1 (1.4)	52 (74.3)	17 (24.3)

n, número de muestras; **CN**, citología normal; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

La asociación de los genotipos de los polimorfismos -579G>T y 46359C>T de la DNMT3B con el riesgo a desarrollar LEIBG, LEIAG y CaCU se muestran en los cuadros 5 a 8. La RM con un IC al 95% fue calculada usando al genotipo TT (-579G>T) y CC (46359C>T) como grupos de referencia. En el análisis de asociación el genotipo GG del -579G>T se mostró como factor de riesgo para el desarrollo de LEIBG y LEIAG (RM: 2.79, IC: 0.68-9.85 y RM: 1.67, IC: 0.27-7.13 respectivamente), cuadro 5. Los genotipos GT y el combinado GT + GG se mostraron con riesgo disminuido en su asociación con CaCU (RM: 0.75, IC: 0.38-1.38 y RM: 0.78, IC: 0.42-1.41, respectivamente).

**Cuadro 5. Genotipos del polimorfismo -579G>T de la DNMT3B y su asociación con LEIBG, LEIAG y CaCU.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>LEIBG RM (IC 95%)</b>	<b>LEIAG RM (IC 95%)</b>	<b>CaCU RM (IC 95%)</b>
<b>TT<sup>a</sup></b>	1	1	1
<b>GT</b>	0.72 (0.25-1.88)	0.90 (0.35-2.23)	0.75 (0.38-1.38)
<b>GG</b>	2.79 (0.68-9.85)	1.67 (0.27-7.13)	1.07 (0.28-3.53)
<b>GT + GG</b>	1.01 (0.42-2.35)	1.01 (0.42-2.35)	0.78 (0.42-1.41)

<sup>a</sup>, categoría de referencia; **RM**, razón de momios; **IC**, intervalos de confianza; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

El análisis del polimorfismo -579G>T y su asociación con LEIBG, LEIAG y CaCU, ajustado por edad y tipo viral se muestra en el cuadro 6. El genotipo GG se comporto como factor de riesgo para los casos con LEIBG (RM: 2.59, IC: 0.74-9.06) y LEIAG (RM: 1.70, IC: 0.42-6.87), pero sin significancia estadística.

**Cuadro 6. Genotipos del polimorfismo -579G>T de la DNMT3B y su asociación con LEIBG, LEIAG y CaCU, ajustada por edad y tipo viral.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>LEIBG RM (IC 95%)</b>	<b>LEIAG RM (IC 95%)</b>	<b>CaCU RM (IC 95%)</b>
<b>TT<sup>a</sup></b>	1	1	1
<b>GT</b>	0.78 (0.31-1.97)	0.99 (0.42-2.33)	0.54 (0.13-2.13)
<b>GG</b>	2.59 (0.74-9.06)	1.70 (0.42-6.87)	0.62 (0.16-2.3)

<sup>a</sup>, categoría de referencia; **RM**, razón de momios; **IC**, intervalos de confianza; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

El cuadro 7 muestra la asociación de los genotipos del polimorfismo 46359C>T de la DNMT3B con respecto al desarrollo de casos con LEIBG, LEIAG y CaCU. Se encontró que los genotipos CT, TT y el combinado CT + TT se mostraron con riesgo disminuido para el desarrollo de LEIBG y LEIAG. El genotipo CT se mostró con asociación significativa para el desarrollo de CaCU (RM: 8.76, IC: 1.3-67.91).

**Cuadro 7. Genotipos del polimorfismo 46359C>T y su asociación con LEIBG, LEIAG y CaCU.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>LEIBG RM (IC 95%)</b>	<b>LEIAG RM (IC 95%)</b>	<b>CaCU RM (IC 95%)</b>
<b>CC<sup>a</sup></b>	1	1	1
<b>CT</b>	0.36 (0.12-1.13)	0.4 (0.14-1.25)	8.76 (1.3-67.91)
<b>TT</b>	0.11 (0.03-0.46)	0.07 (0.01-0.33)	3.06 (0.38-24.60)
<b>CT + TT</b>	0.24 (0.08-0.73)	0.24 (0.08-0.73)	6 (0.78-46.10)

<sup>a</sup>, categoría de referencia; **RM**, razón de momios; **IC**, intervalos de confianza; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

El análisis de regresión logística ajustado por edad y tipo viral para el polimorfismo 46359C>T mostró que los genotipos CT y TT se presentan con riesgo disminuido para los casos con LEIBG y LEIAG, cuadro 8. También se encontró que el genotipo de riesgo CT se encuentra asociado con casos con CaCU, pero su asociación no tiene significancia estadística (RM: 5.04, IC: 0.62-40.67).

**Cuadro 8. Genotipos del polimorfismo 46359C>T y su asociación con LEIBG, LEIAG y CaCU ajustada por edad y tipo viral.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>LEIBG RM (IC 95%)</b>	<b>LEIAG RM (IC 95%)</b>	<b>CaCU RM (IC 95%)</b>
<b>CC<sup>a</sup></b>	1	1	1
<b>CT</b>	0.30 (0.10-0.88)	0.36 (0.13-1.01)	5.04 (0.62-40.67)
<b>TT</b>	0.10 (0.02-0.39)	0.05 (0.01-0.25)	1.22 (0.14-10.54)

<sup>a</sup>, categoría de referencia; **RM**, razón de momios; **IC**, intervalos de confianza; **LEIBG**, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; **LEIAG**, lesión escamosa intraepitelial de alto grado.

#### IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La infección con VPH-AR juega un papel central en la patogénesis de CaCU, sin embargo, se ha establecido que factores genéticos y epigenéticos adicionales hacen más susceptibles a las mujeres para el desarrollo de esta malignidad<sup>5,6</sup>. La principal modificación epigenética involucrada con el desarrollo de cáncer es la metilación<sup>21</sup>. La hipermetilación de islas CpGs localizadas en regiones promotoras de genes está firmemente establecida como un importante mecanismo de inactivación de genes que puede también influenciar la inestabilidad genómica<sup>21</sup>. Por otra parte, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) son la forma más común de variación genética humana<sup>20</sup>. Estudios experimentales han demostrado que algunas variantes polimórficas en regiones promotoras de diversos genes pueden afectar la expresión y modular su actividad por lo que podrían estar asociadas con un incremento en el riesgo de desarrollo de cáncer<sup>20</sup>.

La DNMT3B, metilasa de *nov*o, juega un papel importante en la tumorigénesis; puede silenciar la expresión de genes supresores de tumor o reparadores de DNA a través de la hipermetilación de regiones promotoras<sup>22</sup>. Se ha encontrado que la baja expresión de la DNMT3B, pero no de la DNMT3A, induce a células cancerígenas humanas a apoptosis pero no a células normales<sup>23</sup>. La baja concentración de la DNMT3B reactivó la expresión de genes silenciados por metilación pero no indujo la desmetilación global, tal y como sucede con el déficit específico de la DNMT1<sup>23</sup>. Estos resultados indican que DNMT3B regula el silenciamiento aberrante de ciertos genes, y es esencial para el mantenimiento del estado maligno<sup>23</sup>.

Recientemente se reportaron 5 polimorfismos de un solo nucleótido en el gen DNMT3B relacionados con el desarrollo de cáncer. Dos polimorfismos se localizan en la región codificante (A204S y E368K) y tres en la región promotora (-283T>C, -579G>T y 46359C>T)<sup>19</sup>. En este estudio, los genotipos polimórficos A204S y E368K no se encontraron en la población analizada. Este resultado es similar al reportado por Lee *et al.*,<sup>19</sup> en una población Coreana. En este reporte, después del análisis de 50 casos de cáncer de pulmón y 50 controles sanos se encontró únicamente el

genotipo silvestre (GG) en todos los individuos. Hasta el momento no existen estudios publicados de los polimorfismos de la DNMT3B en lesiones precancerosas y CaCU por lo que este es el primer estudio de casos y controles que analiza la asociación de éstos SNPs en dicha neoplasia.

Por otro lado, el gen de la DNMT3B tiene dos sitios de inicio de la transcripción, uno en el exón 1A y otro en el 1B por lo que la expresión de la enzima es regulada por diferentes promotores. Un promotor está en un área rica en CpGs y el otro promotor es encontrado en un área escasa en CpGs. El polimorfismo -579G>T (-579 pb del sitio de transcripción del exón 1B) está localizado en el promotor escaso en CpGs<sup>19,24</sup>. De lo anterior podemos pensar que si el polimorfismo -579G>T está en una región de escasos CpGs este no es afectado por la metilación de *nov*o y por lo tanto puede mantenerse activo, favoreciendo la libre expresión de la enzima durante el proceso canceroso.

En el análisis de la distribución de la edad el grupo de los casos con CaCU presentó la media de mayor edad (51.8 años). Esta distribución de edad es común, ya que reportes en estudios epidemiológicos señalan que las mujeres que desarrollan este padecimiento tienen una media aproximada de 40-50 años de edad. La infección por VPH 16 fue la más frecuente en los casos con LEIAG (33.3%) y CaCU (67.1%), mientras que el VPH 33 fue el más frecuente en los casos de LEIBG (36.7%). En controles, se encontró que el 25% de las muestras analizadas presentaron infección por algún tipo de VPH, mientras el 75% no presentaron infección. Estos resultados apoyan el hecho de que la infección con VPH-AR principalmente los tipos 16, 33 y 18 son el factor etiológico más importante para el desarrollo del CaCU.

Las frecuencias de los genotipos del polimorfismo -579G>T encontradas en este estudio para casos con CaCU fueron las siguientes; genotipo TT 62.9%, heterocigoto GT 30%, y por último el GG 7.1%; mientras que Fan *et al.*,<sup>25</sup> en individuos con carcinoma de esófago en una población China reportaron al genotipo TT con 77.8%, GT 22.2% y el genotipo GG no fue encontrado<sup>25</sup>. Chang *et al.*,<sup>24</sup> encontraron al

genotipo TT en un 88.1%, GT 11.9%, y tampoco reportó el genotipo GG en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en una población Taiwanesa. Por otra parte Lee *et al.*,<sup>19</sup> reportaron un 78.9% para el genotipo TT, 20.1% GT y 0.9% GG en cáncer de pulmón en una población Coreana. En nuestro grupo control (citología normal) se encontraron las siguientes frecuencias; genotipo TT 57%, GT 37% y GG 6%, mientras que Fan *et al.*,<sup>25</sup> reportaron al genotipo TT con 80.5%, GT 19% y el genotipo GG 0.5%, Chang *et al.*,<sup>24</sup> encontraron al genotipo TT en un 85.5%, GT 14.5%, y no reportó el genotipo GG. Lee *et al.*,<sup>19</sup> reportaron un 73.4% para el genotipo TT, 25.0% GT y 1.6% GG.

Aunque la población estudiada por nosotros fue mexicana y el tipo de cáncer es diferente a los estudiados previamente, la frecuencia del genotipo de referencia TT (58.3%), es similar a la obtenida por los tres estudios publicados sobre este polimorfismo en poblaciones asiáticas, en cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y cáncer de esófago<sup>19,24,25</sup>. Los cuatro grupos de estudio (citología normal, LEIBG, LEIAG y CaCU) presentan frecuencias de los tres genotipos TT, GT y TT muy similares. Las frecuencias reportadas en este estudio para el genotipo GG (6.1% en casos y 6% en controles) y GT (30.3% en casos y 37% en controles) son las más altas comparadas con las de estudios previos.

Los resultados del análisis de asociación sin ajuste de los genotipos del polimorfismo -579G>T en casos con CaCU y lesiones precancerosas, muestran que el genotipo GG actúa como factor de riesgo para el desarrollo de LIEBG y LEIAG con un RM: 2.79, IC: 0.68-9.85 y RM: 1.67, IC: 0.27-7.13. Estos resultados son similares a los reportados por Chang *et al.*,<sup>24</sup> en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en una población de Taiwán (RM: 1.97, IC: 0.79-4.92). Lo que puede explicar la asociación del genotipo GG en casos con LEIBG y LEIAG es el reducido número de muestras analizadas a comparación de los casos con CaCU y controles. El análisis de regresión logística ajustado por edad y tipo viral para el polimorfismo -579G>T y su asociación con LEIBG y LEIAG y CaCU, muestra que el genotipo GT presenta riesgo disminuido para todos los casos, pero sin significancia estadística.

Estos resultados son similares a los reportados por Lee *et al.*,<sup>19</sup> ellos reportaron un RM: 0.47, IC: 0.28-0.81, para adenocarcinoma pulmonar y un RM: 0.51, IC: 0.26-0.99, para carcinoma de células pequeñas en una población Coreana. Sin embargo el genotipo homocigoto GG se muestra como factor de riesgo para el desarrollo de LEIBG (RM: 2.59, IC: 0.74-9.06) y LEIAG (RM: 1.70, IC: 0.42-6.87), sin asociación significativa.

Recientemente, la presencia del polimorfismo de transición 46359C>T se ha reportado como crucial en la actividad del promotor de la DNMT3B, la transición de C a T induce un incremento del 30% en la actividad promotora del gen DNMT3B<sup>22</sup>. Además individuos que presentan el alelo polimórfico T, particularmente heterocigotos, son asociados con predisposición a cáncer de pulmón, próstata, mama y leucemias<sup>23</sup>.

Al comparar nuestros resultados con los trabajos previos, observamos que existe variación en la distribución de los genotipos del polimorfismo 46359C>T. Por ejemplo; en CaCU encontramos las siguientes frecuencias: 74.3% para el genotipo de riesgo CT, 24.3% para el homocigoto TT y 1.4% para el genotipo de referencia CC, mientras que Shen *et al.*,<sup>20</sup> en cáncer de pulmón en una población de E. U. A, reportan 56.7% para el CT, 21% para el TT y 22.3% para el CC. Motgomery *et al.*,<sup>21</sup> reportan CT 49.1%, TT 16.8% y CC 34.1%, en cáncer de mama en una población Británica. En estos dos reportes observamos que la frecuencia del genotipo de riesgo CT es más baja (21% y 49.1%) que la encontrada en la población estudiada por nosotros (74.3%). Esta diferencia puede sugerirnos que la población de nuestro estudio puede ser más susceptible al desarrollo de cáncer en comparación con las otras poblaciones ya estudiadas.

Otra diferencia en la distribución de los genotipos del polimorfismo 46359C>T es observada al comparar las frecuencias reportadas por Wang *et al.*,<sup>22</sup> ellos reportan CT 3.3%, TT 96.7% y CC 0% en adenocarcinoma gástrico en una población China. Wu y Lin reportan un CT 3%, TT 97% y CC 0% en carcinoma hepatocelular en una

población en una población China<sup>26</sup>. Podemos notar que la frecuencia del genotipo CC es 0%, resultado similar al encontrado por nosotros 1.4%, sin embargo la frecuencia de 3% del genotipo de riesgo es baja comparada con el 74.3% de frecuencia encontrada en nuestro estudio.

En nuestros controles el genotipo de riesgo CT y el de referencia CC mostraron las siguientes frecuencias: 47.5% y 8%, mientras Shen *et al.*,<sup>20</sup> reportan 41.8% y 35.0%, Montgomery *et al.*,<sup>21</sup> reportan 45% y 31.8 %, Wang *et al.*,<sup>22</sup> 5.1% y 0%, Wu y Lin<sup>26</sup> 0.7% y 0%; se observa entonces que la frecuencia del polimorfismo 46359C>T varía de acuerdo a la población y tipo de cáncer. Además es importante señalar que la frecuencia del genotipo CT en la población estudiada por nosotros (genotipo de riesgo y más frecuente en nuestro estudio) fue incrementando gradualmente según el grado de lesión; en citología normal 47.5%, en LEIBG del 56.7%, en LEIAG del 63.3% y en CaCU del 74.3%.

En el análisis estadístico de asociación sin ajuste del polimorfismo 46359C>T se encontró que mujeres con un genotipo CT tienen 8.76 veces más riesgo de desarrollar CaCU comparadas con las portadoras del genotipo CC. Esta asociación se mantuvo también en el análisis de regresión logística ajustado por edad y tipo viral, donde portadoras del genotipo CT tienen 5.04 veces más riesgo de desarrollar CaCU. Este genotipo ya ha sido asociado con el riesgo a cáncer. Shen *et al.*, reportan que individuos con el heterocigoto CT tienen 2 veces más riesgo de desarrollar cáncer de pulmón comparados con los homocigotos CC (RM: 2.13). Además, Montgomery *et al.*,<sup>21</sup> reportan que individuos con genotipo CT y CC tienen riesgo significativo para el desarrollo de cáncer de mama (RM: 1.51). Observamos entonces que el riesgo a CaCU encontrado en este trabajo es más alto que los riesgos encontrados en otros estudios previos. Esto puede explicarse debido a lo común del genotipo de riesgo en la población estudiada. En resumen, nuestros resultados sugieren que el genotipo CT del polimorfismo 46359C>T de la DNMT3B está asociado con el incremento en el riesgo a cáncer y puede contribuir a la identificación de individuos susceptibles a CaCU.

Este es el primer estudio que reporta al genotipo TT del polimorfismo 46359C>T con riesgo disminuido para el desarrollo de LEIBG y LEIAG (RM: 0.10, IC: 0.02-0.39; RM: 0.05, IC: 0.01-0.25, respectivamente), dichos resultados deben tomarse con cautela y se sugiere realizar más estudios. Aunque los resultados estadísticos pueden asociar a los polimorfismos -579G>T y 46359C>T de la DNMT3B con CaCU, esta es una patología multifactorial para la cual existen otros factores de riesgo que juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta patología.

El análisis de resultados obtenidos en este trabajo y los observados en otros, deja claro lo importante que es el realizar más estudios sobre estos polimorfismos para poder comprender su implicación con el desarrollo de cáncer. Los resultados obtenidos aportan bases importantes para estudios posteriores y sobre todo, antecedentes directos de estos polimorfismos en una población mexicana.

En conclusión en nuestro estudio el genotipo más frecuente para el polimorfismo -579G>T, fue el genotipo mutante TT; el porcentaje encontrado fue de 57% en controles y en casos con LEIBG fue de 56.7%, con LEIAG 56.7% y 62.9% con CaCU. Mientras que para el polimorfismo 46359C>T, el genotipo más frecuente fue el genotipo de riesgo CT, la frecuencia de este genotipo fue de 47.5% en controles, 56.7% en casos con LEIBG, 63.3% en LEIAG y 74.3% en CaCU. Las mujeres con genotipo CT del polimorfismo 46359C>T de la DNMT3B tienen 8.76 veces más riesgo de desarrollar CaCU comparadas con las portadoras del genotipo CC.

En el presente trabajo no se encontró asociación significativa de genotipos de los polimorfismos -579G>T de la DNMT3B con el desarrollo de lesiones precancerosas y CaCU, además los polimorfismos A204S y E368K no se detectaron en la población estudiada.

Nuestros resultados sugieren que el gen de la DNMT3B puede estar implicado en el desarrollo de lesiones precancerosas y CaCU, aunque estudios con mayor tamaño de muestra son necesarios para confirmar nuestras conclusiones. Debido a que los

polimorfismos genéticos a menudo varían entre grupos étnicos, son necesarios otros estudios para dejar en claro la asociación de estos polimorfismos de la DNMT3B con CaCU en otras poblaciones. Además, estudios de otras variantes de la secuencia del gen de la DNMT3B y su función biológica son también necesarios para entender el papel de los polimorfismos de la DNMT3B en la determinación del riesgo a CaCU.

## V. REFERENCIAS

1. Martínez HC. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. *Rev Biomed* 2006; 17:81-84.
2. Gómez LT, Betancourt MA, Cervantes LM, Carrancá GA, Marina FF, Borges G. Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Publica Mex* 2005;47:342-350.
3. López SA, Lizano SM. Cáncer cervicouterino y el virus del papiloma humano: la historia que no termina. *Rev INCan* 2006; 1: 4-29.
4. Sauvageau C, Duval B, Gilca V, Lavoie F, Ouakki M. Human Papilloma Virus vaccine and cervical cancer screening acceptability among adults in Quebec, Canada. *BMC Public Health* 2007; 7:304.
5. Maciag PC and Villa LL. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 915-922.
6. Gonzales DA, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C and Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005, 4:38.
7. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potencial clinical interventions. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2004; 52.
8. Weisenberger DJ, Velicescu M, Cheng JC, Gonzales FA, Liang G, Jones PA. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. *Mol Cancer Res*. 2004; 2:62-72.
9. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16: 6-2.
10. Plewa JT, Jagodzinski. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10: 631-647.
11. Liu K, Wang YF, Cantemir C, Muller MT. Endogenous Assays of DNA Methyltransferases: Evidence for Differential Activities of DNMT1, DNMT2, and DNMT3 in Mammalian Cells In Vivo. *Am Soc Microbiol*; 2003; 23:2709-19.
12. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* 2000; 9: 2395-2402.

13. Hermann A, Gowher H and Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 2004; 61: 2571-2587.
14. Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research* 2000; 28: 2108-13.
15. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 2291-98.
16. Ehrlich M, Woods CB, Yu MC, Dubeau L, Yang F, Campan M, *et al.* Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*. 2006; 25: 2636-2645.
17. Baylin BS, Esteller M, Rountree RM, Bachman EK, Schuebel K, Herman GJ. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10 : 687-692.
18. Clark JS, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party?. *Oncogene* 2002; 21: 5380-5387.
19. Lee SJ, Jeon HS, Jang JS, Park SH, Lee GY, Lee BH, *et al.* DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 2005;26: 403-9.
20. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A Novel Polymorphism in Human Cytosine DNA-Methyltransferase-3B Promoter Is Associated with an Increased Risk of Lung Cancer. *Cancer Research* 2002; 62: 4992-4995.
21. Montgomery KG, Liu MCP, Eccles DM, Campbell IG. The DNMT3B C>T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004;6: 390-394.
22. Wang YM, Wang R, Wen DG, Li Y, Guo W, Wang N, *et al.* Single nucleotide polymorphism in DNA methyltransferase 3B promoter and its association with gastric cardiac adenocarcinoma in North China. *World J Gastroenterol* 2005; 11:3623-7.
23. Beaulieu N, Morin S, Chute IC, Robert MF, Nguyen H, MacLeod AR. An Essential Role for DNA Methyltransferase DNMT3B in Cancer Cell Survival. *J Biol Chem* 2002; 277: 28176-28181.

24. Chang KP, Hao SP, Liu CT, Cheng YL, Lee YS, et al. Promoter polymorphism of DNMT3B and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in Taiwan: A case-control study. *Oral Oncol* 2007; 43, 345-351.
25. Fan H, Liu S, Zhang H, Hu B, Zhang F, Zhao J. DNMT3B 579 G>T promoter polymorphism and risk of esophagus carcinoma in Chinese. *World J Gastroenterol* 2008; 14(14): 2230-2234.
26. Wu Y, Lin SJ. DNA methyltransferase 3B promoter polymorphism and its susceptibility to primary hepatocellular carcinoma in the Chinese Han nationality population: A case-control study. *World J Gastroenterol* 2007; 13(45): 6082-6086.