



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**"Polimorfismo -149C>T, expresión de la DNA
metiltransferasa 3B y metilación de los promotores
de los genes FHIT y MGMT en la carcinogénesis
cervical "**

T E S I S

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

**PRESENTA:
MARIA GUADALUPE RIVERATREJO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR**

Chilpancingo, Gro., Diciembre, 2010

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de investigación de Biomedicina Molecular y Citopatología Ginecológica, de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la U.A.G., a cargo de la Dra. Berenice Illades Aguiar y la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero respectivamente, siendo becaria CONACYT de Septiembre de 2008 a Julio 2010.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto “Marcadores potenciales indicadores de progresión de lesiones premalignas a cáncer cervical: Variantes génicas del virus del papiloma humano, integración del genoma viral y metilación de genes reparadores y supresores de tumor” *clave*: GUE 2002 01-6523 apoyado por FOMIX Guerrero-CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por cuidar siempre mis pasos y permitirme culminar cada uno de mis sueños, porque sin él nada hubiera sido posible.

Agradezco de manera especial a la Dra. Berenice Illades Aguiar, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por sus consejos y por confiar en mí para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, al MC Daniel Hernández Sotelo y a la Dra. Esther López-Bayghen Patiño, por formar parte de mi comité, por las observaciones y aportaciones realizadas a este trabajo.

Agradezco a Paola y Natividad por su apoyo administrativo y las facilidades que me otorgaron para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a los integrantes de la Maestría en Ciencias Biomédicas de la generación 2008-2010, Betzabeth, Nathalia, Magali, Adrian, Jorge, Jesús y José Antonio, por su amistad, cariño y por estar siempre en el momento indicado, sin ustedes simplemente esta historia no hubiera sido maravillosa. Los quiero mucho y los extrañare siempre.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, gracias por ser mi ejemplo y fortaleza a lo largo de mi vida e impulsarme a seguir y alcanzar mis sueños, por su amor y cariño incondicional, los amo.

Dedico este trabajo a mis hermanos Victor, Mónica, Jaime, Graciela y Concepción, gracias por cuidarme, aconsejarme y escucharme, los quiero mucho.

Dedico este trabajo Emireth, Jean Paul, Carlos, Jessica, Cesar, Fernanda, Alejandro, Mariana y Erick, por ser esos angelitos que Dios envió para enriquecer nuestras vidas.

Dedico este trabajo a Alfonsina, Hugo, Carmen, Alexis, Estelí, Perla y Alinne por compartir mil cosas hermosas, por su amistad, porque aunque nos encontremos lejos siempre ocupan un lugar muy especial en mi corazón, los quiero muchos amigos.

Dedico este trabajo a Emmanuel, gracias por estar a mi lado, por tu amor y comprensión en este tiempo y por brindarme tu gran apoyo. Gracias por formar parte de mi vida, te amo mi amor.

“Polimorfismo -149C>T, expresión de la DNA metiltransferasa 3B y metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT en la carcinogénesis cervical”

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II.MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
III. RESULTADOS.....	11
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	21
VI. REFERENCIAS.....	25

RESUMEN

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es necesaria en el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU), pero es claro que intervienen otros factores que favorecen la progresión, como las alteraciones epigenéticas. Entre las cuales se encuentra la metilación de DNA que es, catalizada por una familia de DNA metiltransferasas de las cuales destaca la DNMT3B. Se ha observado la sobreexpresión de DNMT3B y la asociación de varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen DNMT3B, además del genotipo CT del SNP-149C>T (C46359T), como factor predisponente para el desarrollo de cánceres como el cáncer pulmonar, mama, entre otros. Por otra parte, la inactivación por metilación de genes como FHIT (supresor de tumor), MGMT (reparador de DNA) y otros se ha relacionado con la progresión de cáncer de pulmón y CaCU. El objetivo de este estudio fue analizar la relación del SNP-149C>T con el nivel de expresión de la enzima DNMT3B y metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT en mujeres con lesiones precursoras y CaCU. Se analizaron 159 muestras exocervicales, 34 sin lesión escamosa intraepitelial (LEI) sin VPH, 56 sin LEI con VPH, 58 con LEIGB (LEI de grado bajo), 2 con LEIGA (LEI de grado alto) y 9 con cáncer cérvicouterino (CaCU). La detección de VPH se realizó mediante PCR (MY09/11 o GP5+/6+) y la genotipificación mediante RFLPs o secuenciación. La genotipificación del SNP-149C>T por PCR y RFLPs. La expresión de DNMT3B por inmunocitoquímica y metilación de los genes FHIT y MGMT por PCR-SM. La proteína DNMT3B se expresó en el 29% de pacientes sin LEI VPH negativo, 71% con LEIGB, 50% con LEIGA y 78% con CaCU ($p<0.001$). No hubo diferencia significativa entre el SNP-149C>T y la expresión de la DNMT3B ($p=0.59$). No hay diferencia significativa entre la expresión de DNMT3B y la metilación de los promotores de FHIT ($p=0.43$) y MGMT ($p=0.56$). Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína DNMT3B es frecuente en presencia de LEIGB y CaCU y que el polimorfismo no influye sobre el nivel de expresión de DNMT3B.

ABSTRACT

Infection with human papilloma virus (HPV) is necessary in the development of cervical cancer (CC), but clearly other factors that favor progression, and epigenetic alterations. Among them is DNA methylation is catalyzed by a family of DNA methyltransferases which highlights the DNMT3B. It has been observed overexpression of DNMT3B and the association of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the DNMT3B gene, in addition to the CT genotype of SNP -149C> T (C46359T), as a predisposing factor for the development of cancers such as lung cancer , breast cancer, among others. On the other hand, inactivation by methylation of genes such as FHIT (tumor suppressor), MGMT (DNA repair) and others has been associated with progression of lung cancer and cervical cancer. The aim of this study was to analyze the relationship of SNP-149C> T with the level of enzyme expression and methylation DNMT3B promoters of MGMT and FHIT genes in women with precursor lesions and cervical cancer. 159 samples were analyzed exo-endocervical, 34 without squamous intraepithelial lesion (SIL) without HPV, HPV 56 without SIL, 58 L-SIL (low-grade SIL) 2 with H-SIL (high-grade SIL) and 9 with cervical cancer (CC). HPV detection was performed by PCR (MY09/11 or GP5 + / 6 +) and genotyping by RFLP or sequencing. Genotyping of SNP-149C> T by PCR and RFLP. DNMT3B expression by immunohistochemistry and methylation of MGMT and FHIT genes by PCR-SM. DNMT3B protein was expressed in 29% of patients without HPV negative SIL, L-SIL 71%, H-SIL 50% and 78% with CC ($p = <0.001$). There was no significant difference between the SNP-149C> T and the expression of DNMT3B ($p=0.59$). No significant difference between DNMT3B expression and methylation of the promoters of FHIT ($p=0.43$) and MGMT ($p=0.56$). These results suggest that DNMT3B protein expression is frequent in the presence of L-SIL and CC and that the polymorphism does not influence the expression level of DNMT3B.

I.INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCU) representa un importante problema de salud pública en países en desarrollo como lo es México. Se ha demostrado que la infección por tipos de VPH de alto riesgo es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de CaCU (Steben y Duarte-Franco, 2007; Illades-Aguilar *et al.*, 2009). Por lo que es claro que intervienen otros factores que favorecen esta progresión, entre los cuales se encuentran cambios epigenéticos, tales como las alteraciones en la metilación de DNA.

La metilación de DNA juega un papel importante en la estabilidad cromosomal, expresión de genes, diferenciación celular, impronta genómica, silenciamiento de transposones y la inactivación del cromosoma X en las mujeres (Lee *et al.*, 2005; Gowher y Jeltsch, 2002). La metilación de dinucleótidos CpG en el genoma humano es catalizada por DNA metiltransferasas (DNMTs), una familia cuyos miembros más representativas son DNMT1, DNMT2 y DNMT3 (Fan *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008). La DNMT1 se clasifica como de mantenimiento, la DNMT2 metila el RNAt encargado del transporte del ácido aspártico y las DNMT3a y la DNMT3B son de *novo* (Goll *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de la DNMT3B se ha observado en varios tipos de cánceres como el de pulmón, leucemia y mama lo que aporta evidencias de su posible participación en el desarrollo de cáncer (Lin *et al.*, 2005). Sin embargo, su papel en el silenciamiento epigenético de muchos genes no está del todo claro. El gen DNMT3B posee polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que pueden estar implicados en la carcinogénesis. Entre estos se encuentran A204S y E368K que se localizan en la región codificante y -283T>C y -579G>T que se encuentran en su región promotora (Lee *et al.*, 2005). El -149C<T (C46359T) se encuentran en la región promotora de la isoforma Δ DNMT3B (localizada en la posición 1570351, número de acceso NT_028392) la cual se localiza -149 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen DNMT3B, entre el intrón 4 y el exón 5 de este gen (Reeves *et al.*, 2009).

La primera evidencia de que el SNP-149C>T del promotor de DNMT3B podría estar asociado con el riesgo para el desarrollo de cáncer, fue reportada en cáncer de pulmón en un grupo de pacientes no hispanos, particularmente en portadores heterocigotos CT. (Shen *et al.*, 2002). Recientemente García Aguilar *et al.* (2009) analizaron varios polimorfismos del gen DNMT3B en 130 pacientes con lesiones precursoras y CaCU, entre ellos el SNP-149 C>T (C46359T), reportando una mayor frecuencia de mujeres con el genotipo CT de dicho polimorfismo, la cual fue incrementando según el grado de lesión. Sugiriendo una asociación con el aumento de riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino comparadas con las portadoras del genotipo CC.

En varios cánceres humanos, la DNMT1 y DNMT3B son sobreexpresadas. Varios estudios han vinculado la metilación de *nov*o de CpGs promotoras con la sobreexpresión de DNMTs. Llevando al silenciamiento de genes supresores de tumor y reparadores de DNA, contribuyendo en la progresión de cánceres humanos (Lee *et al.*, 2005).

El gen FHIT se localiza en el cromosoma 3p14.2, FHIT es una hidrolasa que está relacionada (al comparar su secuencia de aminoácidos) con la superfamilia de proteínas cuyo dominio característico es una triada de histidinas (HIT). Estas son proteínas de unión a nucleótidos que hidrolizan a diadenosinas polifosfatadas como Ap₃A y Ap₄A. Se ha propuesto que Ap₄A estimula la actividad de la DNA polimerasa y que su acumulación debido a la pérdida de la función de FHIT puede ocasionar proliferación celular y el subsecuente desarrollo de un tumor (Butler *et al.*, 2000). Las regiones promotoras de FHIT, no se encuentran metiladas en ausencia de procesos cancerígenos y por lo tanto existe una transcripción normal.

Hernández *et al.*, (2004) observaron que la metilación del promotor del gen FHIT es un evento temprano de la carcinogénesis cervical. Castro *et al.*, (2005) mostraron que la pérdida de expresión del gen FHIT es un evento frecuente en CaCU. Zöchbauer *et al.*, (2001) observaron que la metilación de FHIT es un evento frecuente en cáncer de pulmón de células no pequeñas y de mama, siendo la metilación un mecanismo importante para la pérdida de expresión de este gen.

MGMT es un gen reparador de DNA, se localiza en el cromosoma 10q 26, contiene 5 exones. Codifica para una proteína reparadora de daño al DNA que elimina por reversión directa grupos alquilo del O⁶ de la guanina. Con lo que previene mutaciones, protege contra carcinogénesis y de efectos citotóxicos de agentes alquilantes. MGMT se expresa en todas las células y tejidos humanos, se ha observado que en algunos tipos de cánceres su expresión disminuye o se pierde (Kent *et al.*, 2000; Danam *et al.*, 2005).

MGMT tiene una isla CpG en su promotor, carece de caja TATA o CAAT. Se sabe que la expresión de MGMT no se encuentra disminuida o eliminada por mutaciones, rearrreglos del gen o inestabilidad del RNAm, sino por la metilación de CpGs en el extremo 5' de su promotor. Así lo muestran Hernández *et al.*, (2004) donde observaron que la metilación del promotor del gen MGMT es un evento temprano de la carcinogénesis cervical.

A pesar de las evidencias mencionadas, se desconoce si mujeres que poseen el genotipo CT del polimorfismo -149C>T (C46359T) tienen sobreexpresión de la enzima DNMT3B y si dicha sobreexpresión incrementa la metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT.

En este estudio, nosotros hipotetizamos que la presencia del genotipo CT del polimorfismo -149 C>T (46359C>T) aumenta la expresión de la proteína DNMT3B, lo que ocasiona la metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT en mujeres con lesiones precursoras y CaCU.

Entender los eventos moleculares que inician y mantienen el silenciamiento epigenético de genes puede conducir al desarrollo de estrategias clínicas para la prevención de cáncer así como terapias que reviertan los procesos de silenciamiento.

II.MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio y obtención de muestras

Se realizó un estudio transversal, en donde se incluyeron mujeres mexicanas con residencia en el Estado de Guerrero en el periodo de diciembre de 1997 a abril de 2010. A todas las pacientes se les realizó un estudio citológico, se emitió un diagnóstico basándose en el sistema de Bethesda y se les realizó tipificación viral del VPH. Se estudiaron un total de 159 pacientes, distribuidas de la siguiente manera: 34 pacientes sin LEI VPH negativo, 56 sin LEI VPH positivo, 58 con LEI de grado bajo (LEIGB), 2 con LEI de grado alto (LEIGA) y 9 con CaCU. Las pacientes con LEIGA no fueron incluidas en el análisis estadístico debido al bajo número de muestras pertenecientes a este grupo. Se incluyeron en el estudio mujeres que no recibieron tratamiento y que no estuvieran relacionadas genéticamente.

A todos los grupos de mujeres se les realizó una encuesta con datos socioeconómicos, historia reproductiva, comportamiento sexual y firmaron un consentimiento informado.

Para el análisis citológico y detección de VPH, las muestras fueron colectadas de las zona de transformación escamo cilíndrica del cérvix uterino. Se realizó una toma del exocérnix con una espátula Ayre y otra toma del endocérnix con un cepillo cervical. Parte de la muestra se utilizó para la examinación citomorfológica usando la tinción de Papanicolaou convencional, otra parte del material se depositó en un frasco con líquido de preservación para realizar citología líquida, utilizando el kit Liqui-PREP™. Para la detección de VPH, el cepillo cervical con la muestra se colocó en buffer de lisis (10 mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0 y 0.5% de SDS).

Detección y tipificación de VPH

El DNA fue extraído mediante el método estándar de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, previa digestión con proteinasa K (Leornard *et al.*, 1994). La detección de VPH se realizó utilizando los iniciadores MY09 y MY11 amplificando una región de 450 pb. La mezcla de PCR en un volumen total de 50 µl consto de 1 µg de DNA blanco, 0.8 µM de cada iniciador, 2mM MgCl₂, buffer de PCR 10X, 150 µM de dNTPs

y 1.25 U de *Ampli Taq GoldTM* (Applied Biosystems, Foster City, CA). El DNA fue amplificado en un termociclador (Eppendorf) con los siguientes pasos: 10 min de desnaturalización a 95°C, seguido por 40 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C.

La integridad de las muestras se verificó por amplificación de una región de 280 pb del gen β -globina humana utilizando los iniciadores PC04 y GH20. Plásmidos del VPH 16, células CaSki y HeLa fueron usadas como controles positivos, DNA humano sin DNA del VPH y agua fueron usados como controles negativos.

Para tipificar el VPH, los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamHI*, *Ddel*, *HaeIII*, *Hinfl*, *PstI*, *RsaI* y *Sau3AI* (Invitrogen, Carlsbad, CA) y analizados por restricción de fragmentos polimórficos (RFLP) para identificar más de 40 tipos de VPH genitales (Bernard *et al.*, 1994).

Cuando las muestras analizadas con los iniciadores MY09 y MY11 fueron negativas o no era posible identificar el tipo de VPH por RFLPs, se evaluó mediante PCR anidada por GP5+/6+. Después de la purificación de los productos de PCR usando isopropanol al 75% y columnas (Centri-Sep Spin Columns, Applied Biosystems, Foster City, CA), fueron secuenciados a través del secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic de Applied Biosystems. El análisis de datos se comparó utilizando el software BLAST vía internet con la base de datos de genes del NCBI-GenBank. Los tipos de VPH fueron clasificados como de alto riesgo o bajo riesgo de acuerdo a la clasificación de Muñoz *et al.*, (2006).

Genotipificación del SNP -149C>T de DNMT3B

La genotipificación del polimorfismo se realizó a través de PCR y RFLPs utilizando un par de iniciadores, sentido 5'-TGCTGTGACAG GCAGAGCAG-3' y el antisentido 5'-GGTAGCCGGGAA CTCCACGG-3' amplificando una región de 380pb. La mezcla de PCR en un volumen total de 25 μ l consto de ~100 ng de DNA genómico, 0.2 μ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl₂, 1 X de buffer para PCR 10X (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0.52 mM de DNTPs y 0.04 U de *Taq* DNA platinum (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). El DNA fue amplificado en un termociclador (Eppendorf) con los siguientes pasos: 10 min de desnaturalización

inicial a 95°C, seguido de 35 ciclos de: 30 s a 95°C, 30 s a 67°C, 30 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. El producto de amplificación se analizó en geles de agarosa al 2.0%. Posteriormente el producto de PCR de 380 pb fue digerido con la enzima de restricción *AvrII* (New England, Biolabs) y los productos fueron analizados en geles de agarosa al 3.5%, se tiñeron con bromuro de etidio [0.5 µg/µl] y fueron visualizados bajo luz UV. El genotipo T/T del SNP -149C>T de la DNMT3B se identificó por la presencia de dos bandas de 173 y 207 pb, el genotipo silvestre C/C por la presencia de una sola banda de 380 pb, mientras que los heterocigotos C/T se identificaron con tres bandas, 173 pb, 207 pb y 380 pb (Shen *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2008).

Análisis Inmunocitoquímico de DNMT3B

El material colocado en el líquido de preservación para citología líquida, se agitó vigorosamente, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y decantó el sobrenadante. Se preparó una dilución 1:5 del material celular en 100µL de solución encapsuladora, para realizar extendidos en laminillas silanizadas. La evaluación de la expresión y localización celular de la proteína DNMT3B se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNMT3b (IMGENEX, USA) con una dilución 1:30 (Chen, *et al.*, 2006; Lin, *et al.*, 2005) por medio de la técnica Streptavidina Biotina Peroxidasa, utilizando el sistema de detección Cytoscan HRP/DAB Cell (Cell Marque Corporation, Hot Springs, AR).

La recuperación antigénica (InmunoDNA retriever con citratos; BioSB, Inc, Santa Bárbara, CA, EUA), se realizó en una olla pascal (DaKo) a una presión de 110°C durante 3 minutos. Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario diluido 1:30 y se incubó a temperatura ambiente por 60 min, se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado durante 40 min, se adicionó la estreptavidina peroxidasa por 20 min, posteriormente se agregó 3,3'-diaminobencidina (DAB) por 1 min, se contratiñó con hematoxilina por 1 min (Chen, *et al.*, 2006; Lin, *et al.*, 2005), se deshidrató con H₂O destilada, alcohol de 70%, alcohol de 96%, alcohol absoluto, xilol y se montó para su posterior observación microscópica.

Se utilizó en cada corrimiento inmunocitoquímico, como control positivo tumor primario de cáncer de mama en el que se ha demostrado expresión de DNMT3B y como control negativo las mismas células omitiendo el anticuerpo primario durante los corrimientos (Lin, *et al.*, 2005).

Para evaluar la expresión de DNMT3B, se determinó el porcentaje de núcleos positivos. La lectura se realizó contando un total de 100 células, donde 0 se consideró cuando no había núcleos teñidos, + cuando había una tinción del 1-10%, ++ cuando la tinción era de 11-50%, +++ cuando era más del 50%. Las muestras con resultados de 0 y + se consideraron como negativas y aquellas con resultados de ++ y +++ fueron consideradas como positivas (Chen, *et al.*, 2006).

Modificación con bisulfito de sodio y PCR sensible a metilación (PCR-SM) de los genes FHIT y MGMT

La metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT se determinó a través de PCR-SM. La modificación con bisulfito de sodio se hizo con el kit de modificación ADN EZ de Zymo Research. En este proceso las citosinas no metiladas son convertidas a uracilo y las citosinas metiladas se mantienen intactas. Se utilizó 1 µg de DNA para realizar la modificación.

Los iniciadores para el gen MGMT fueron: para secuencias no metiladas, el sentido 5' TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT3', antisentido, 5' AACTCCACA CTCTTCCAAAAACAAAACA3' y para secuencias metiladas el sentido 5' TTTCGAC GTTCGTAGGTTTTTCG3', antisentido 5' GCACTCTTCCGAAAAC GAAACG3'. Para el gen FHIT los iniciadores fueron: para secuencias no metiladas, el sentido, 5' TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTTATG3', antisentido, 5' CATAACAACACCAAC CCCACTA3', y para secuencias metiladas, el sentido 5' TTGGGGCGCGGGTTTGG GTTTTTACGC3', antisentido, 5' CGTAAACGACGCCGACCCCACTA3'. La mezcla de PCR se realizó en un volumen total de 25 µl, consto de ~1 µg DNA modificado con bisulfito de sodio, iniciadores (concentración final 0.8 µM), MgCl₂ (concentración final 2 mM), buffer de PCR Gold 10X (concentración final 1.5X), deoxinucleótidos trifosfato (concentración final 1 mM) y 1.25 U de ampli taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR-SM de los genes MGMT y FHIT se llevaron a

cabo en un termociclador (Eppendorf), en 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, temperatura de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 59°C (MGMT metilado y no metilado), 65°C (FHIT metilado y no metilado) y extensión a 72°C, todos por 30 s y un paso final de extensión a 72°C por 10 min (FHIT) y 8 min (MGMT). Como control positivo para las secuencias no metiladas se uso DNA de leucocitos humanos de sangre periférica y como control positivo para secuencias metiladas DNA de leucocitos humanos tratados con Sssl metiltransferasa (New England BioLabs, Inc.). Como controles negativos se incluyeron muestras sin DNA en cada PCR-SM que se realizó. Los productos de PCR-SM fueron analizados en geles de agarosa al 3.5% para las secuencias metiladas y no metiladas, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo luz UV. (Esteller *et al.*, 1999; Zöchbauer-Müller *et al.*, 2001).

Análisis Estadístico

Para el análisis descriptivo las variables cualitativas se expresaron como frecuencia absoluta (n) y relativa (%), las continuas normales se expresaron como media y desviación estándar y las que no presentaron normalidad se expresaron con mediana y rango intercuartil. Fueron empleadas las pruebas estadísticas de *t student* para la comparación de dos variables, una categórica y una numérica para las que tengan distribución normal o su análoga Mann-Whitney para variables que no presentaron normalidad. X^2 fue útil para la comparación de frecuencias entre dos grupos. Posteriormente se determinó el equilibrio de Hardy Weinberg del polimorfismo -149 C>T. Se realizó análisis de correlación a través del coeficiente de correlación de Pearson entre las variables. Para determinar si existía asociación sobre las variables dependientes se realizaron modelos de regresión logística. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico STATA 9.0 considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

III.RESULTADOS

Se analizaron las características generales de una población de 159 pacientes, dividida en cinco grupos, 34 sin LEI VPH negativo, 56 sin LEI VPH positivo, 58 con LEIGB, 2 con LEIGA y 9 con CaCU. Como muestra la tabla 1, se observaron diferencias significativas en cuanto a las edad ($p<0.001$), menopausia ($p=0.01$) y el inicio de vida sexual activa ($p<0.001$) entre los grupos de estudio.

Tabla 1. Características generales de la población estudiada.

Variable	Sin LEI VPH negativo		Sin LEI VPH positivo		LEIGB		LEIGA		CaCU		Valor de <i>p</i>
	n=34		n=56		n=58		n=2		n=9		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Edad^a (años)	40 (36-43)		35.5 (28.5-41.5)		34 (27-44)		39.5 (35-44)		48 (48-50)		<0.001
Menopausia^b											0.01
Premenopáusica	32 (94)		49 (88)		54 (93)		2 (100)		5 (56)		
Postmenopáusica	2 (6)		7 (12)		4 (7)		0 (0)		4 (44)		
IVSA (años)											<0.001
<18	5 (15)		8 (14)		4 (7)		2 (100)		6 (67)		
>18	28 (85)		48 (86)		50 (93)		0 (0)		3 (33)		
Paridad											0.03
Ninguno	3 (9)		9 (16)		15 (27)		1 (50)		0 (0)		
1 ó 2	13 (39)		26 (46)		22 (39)		0 (0)		1 (11)		
Más de 2	17 (52)		21 (38)		19 (34)		1 (50)		8 (89)		

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), LEIGA (Lesión escamosa intraepitelial de grado alto), CaCU (Cáncer cervicouterino) e IVSA (Inicio de vida sexual activa).

^a Dato expresado en mediana (p25-p75), prueba Kruskal Wallis

^b Dato expresado en *n* y %, prueba de χ^2

Genotipificación del polimorfismo -149 C>T del gen DNMT3B

Se realizó la genotipificación del SNP -149C>T por medio de PCR y RFLP's. En la figura 1 se muestra un ejemplo representativo de un producto de 380 pb generado por la técnica de PCR. En la figura 2, se ilustra la digestión de un producto de 380 pb del gen DNMT3B utilizando la enzima *AvrII*, permitiendo identificar 3 diferentes genotipos del gen DNMT3B (CC, CT, TT), analizados en geles de agarosa. La tabla 2 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP-149 C>T de acuerdo al grado citológico e histológico. No se encontró diferencias con significancia estadística entre los grupos de estudio ($p=0.36$). El SNP-149C>T del gen DNMT3B se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los grupos de estudio. La

frecuencia alélica entre las pacientes sin LEI VPH negativo para C fue de 31% y para T de 69%, en las pacientes sin LEI VPH positivo fue de 37% y 63% respectivamente, en las pacientes con LEIGB fue de 32% y 68% respectivamente, y en las pacientes con CaCU fue de 17% y 83% respectivamente.

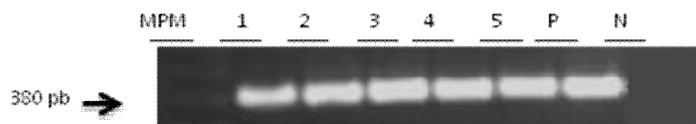


Fig. 1. Polimorfismo – 149C>T. Productos de PCR en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular, 1 – 5 muestras; P, control positivo; N, control negativo.



Fig. 2. Genotipos del gen DNMT3B (CC, CT, TT) generados por la enzima de digestión AvrII.

Tabla 2 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C-149T de los grupos de estudio.

SNP -149C>T	Sin LEI	Sin LEI	LEIGB	CaCU	Total	Valor de p^a
	VPH negativo	VPH positivo	VPH positivos			
	n=34	n=55	n=58	n=9		
	n %	n %	n %	n %	n %	
Genotipos						0.36
CC	2 (6)	7 (13)	5 (9)	1 (11)	15 (9)	
CT	17 (50)	27 (49)	27 (46)	1 (11)	74 (47)	
TT	15 (44)	21 (38)	26 (45)	7 (78)	69 (44)	
Alelos						0.43
C	21 (31)	41 (37)	37 (32)	3 (17)	102 (33)	
T	47 (69)	69 (63)	79 (68)	15 (83)	210 (67)	

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), CaCU (Cáncer cervicouterino) y SNP (polimorfismo de un solo nucleótido).
^a prueba de χ^2

Presencia de la proteína DNMT3B

La figura 3, presenta resultados que ilustran la expresión de la proteína DNMT3B por inmunocitoquímica. En la tabla 3, se muestra la frecuencia de expresión de la proteína DNMT3B de 29% tanto en el grupo de pacientes sin LEI VPH negativo como el de VPH positivo, de 71% en pacientes con LEIGB y 78% en pacientes con CaCU. Dicha expresión fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Tabla 3. Frecuencia de expresión de la proteína DNMT3b por grupo de estudio.

Nivel de expresión	Sin LEI	Sin LEI	LEIGB	CaCU	Valor de p^a
	VPH negativo	VPH positivo	VPH positivo		
	n=34	n=56	n=58	n=9	
	n %	n %	n %	n %	
Expresión DNMT3b					<0.001
Negativo	24 (71)	40 (71)	17 (29)	2 (22)	
Positivo	10 (29)	16 (29)	41 (71)	7 (78)	

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), CaCU (Cáncer cervicouterino).
^a a prueba de χ^2

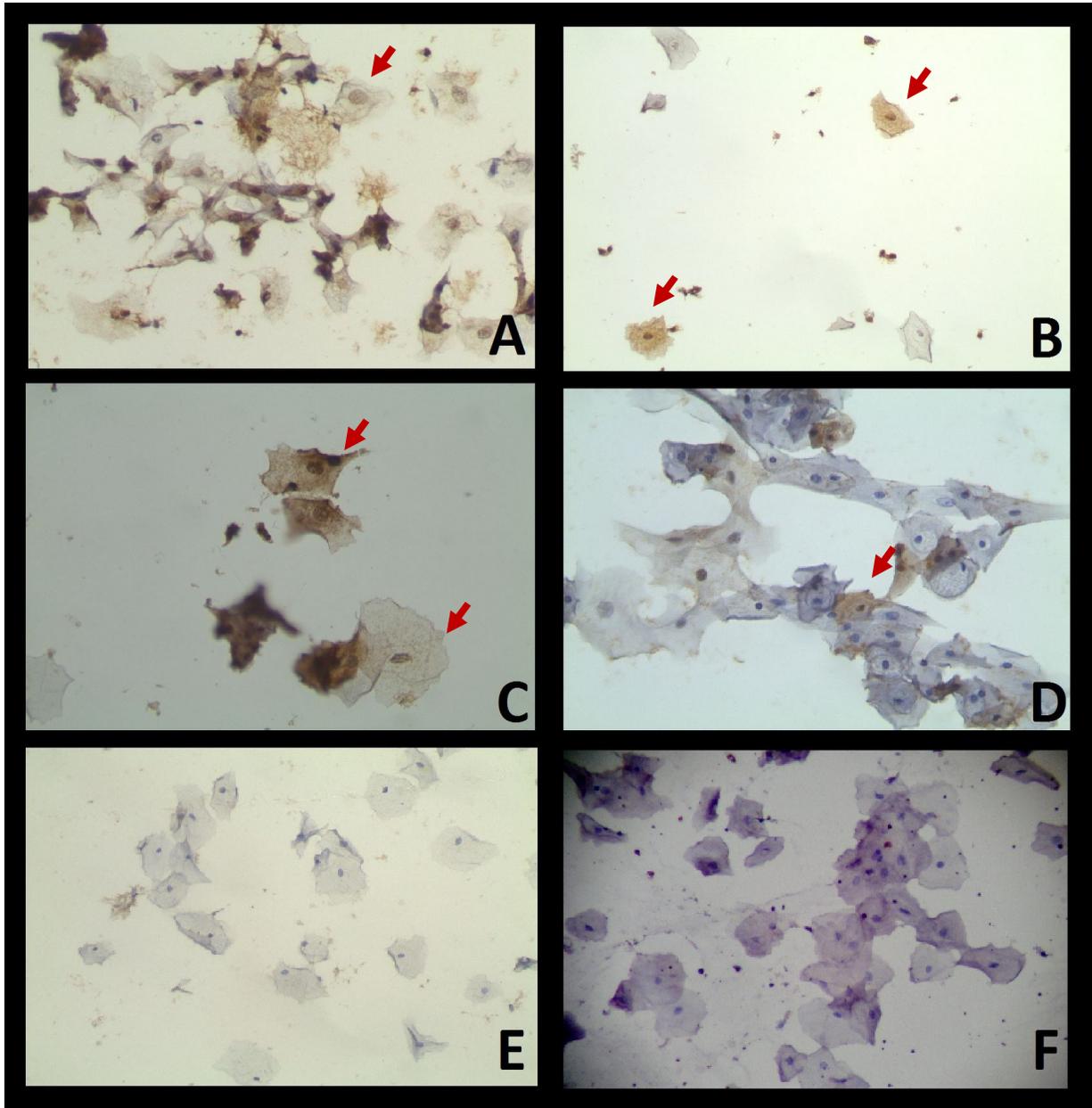


Fig. 3. Expresión de DNMT3B en LEIGB y citologías sin LEI en presencia y ausencia del VPH. (A) Inmunomarcaje en células con kariomegalia en LEIGB. (B) Expresión de marcador en células con kariomegalia en LEIGB. (C) Expresión de DNMT3B en células con kariomegalia en un caso de LEIGB más VPH-AR. (D) Expresión de DNMT3B en células intermedias sin LEI VPH negativo. (E) Ausencia de expresión en células intermedias en una paciente sin LEI VPH positivo. (F) Ausencia de DNMT3B en células intermedias sin LEI VPH negativo. Técnica: Estreptavidina Biotina Peroxidasa (40X).

Metilación del promotor de los genes FHIT y MGMT

En la figura 4 y 5 se muestran ejemplos representativos de los productos de PCR-SM, analizados en geles de agarosa, para los genes FHIT y MGMT. Como muestra la tabla 4, se encontró en el grupo de pacientes sin LEI VPH negativo una frecuencia de metilación del promotor del gen FHIT de 53%, en el grupo sin LEI VPH positivo 68%, en el grupo con LEIGB 57%, y en el grupo con CaCu 67% de metilación. Respecto al promotor del gen MGMT, la frecuencia de metilación en pacientes sin LEI VPH negativo fue de 53%, en pacientes sin LEI VPH positivo y LEIGB 45% respectivamente, y pacientes con CaCU 44% de metilación. No se observaron diferencias significativas en ambos genes ($p=0.43$ y $p=0.56$ respectivamente).

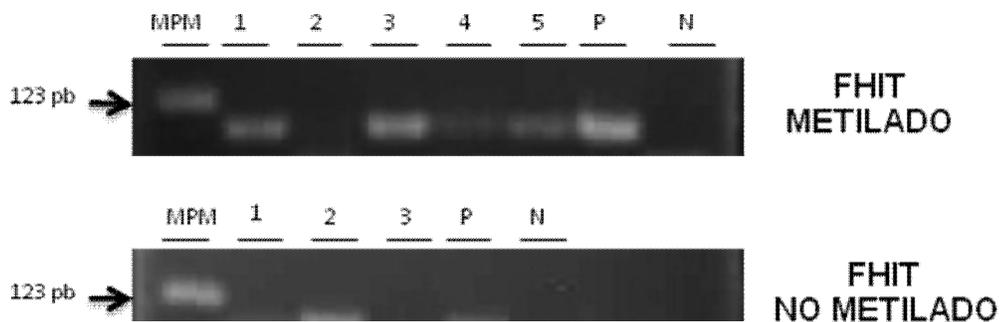


Fig. 4. PCR-SM de FHIT en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; 1 – 5 y 1 - 3, muestras cervicales; P, control positivo; N, control negativo.

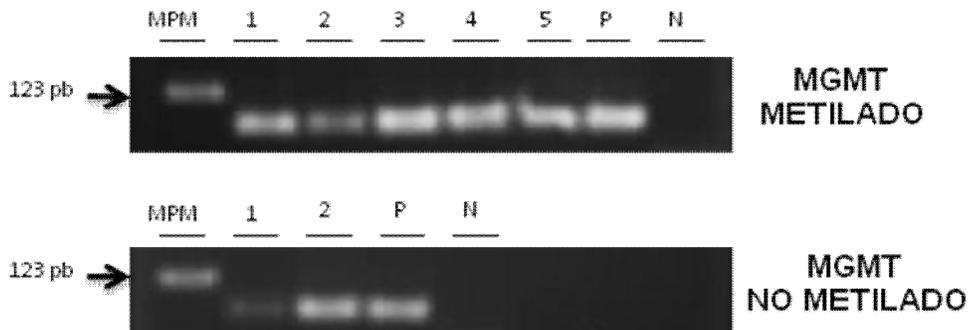


Fig. 5. PCR-SM de MGMT en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; 1 – 5 y 1 - 2, muestras cervicales; P, control positivo; N, control negativo.

Tabla 4. Frecuencia de metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT de los grupos de estudio.

Metilación	Sin LEI		Sin LEI		LEIGB	CaCU	Valor de p^a	
	VPH negativo		VPH positivo		VPH positivo			
	n	%	n	%	n	%		
Metilación FHIT							0.43	
No metilado	16	(47)	18	(32)	25	(43)	3	(33)
Metilado	18	(53)	38	(68)	33	(57)	6	(67)
Metilación MGMT							0.56	
No metilado	16	(47)	31	(55)	32	(55)	5	(56)
Metilado	18	(53)	25	(45)	26	(45)	4	(44)

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), CaCU (Cáncer cervicouterino).
^a prueba de χ^2

SNP-149C>T y expresión de la DNMT3B

En la tabla 5, se concentran resultados de la expresión de la proteína DNMT3B por genotipo del SNP-149C>T en cada grupo de estudio. Las pacientes sin LEI VPH negativo portadoras del genotipo CC no expresaron la proteína DNMT3B, si la expresaron el 70% de portadoras del CT y 30% en portadoras del TT. En pacientes sin LEI VPH positivo se observó una frecuencia de 13% en portadoras del genotipo CC, 37% para el genotipo CT y 50% para el genotipo TT. En el grupo de LEIGB la frecuencia de expresión fue de 12% en portadoras del genotipo CC, 42% en CT y 46% en TT. En el grupo de pacientes con CaCU se reportó una frecuencia de expresión de 14% en portadoras del genotipo CC y CT respectivamente y 72% en portadoras del genotipo TT. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de la enzima DNMT3B por genotipo del SNP-149C>T en cada grupo de estudio ($p=0.59$).

Tabla 5. Expresión de la proteína DNMT3B por genotipo del SNP-149C>T.

Expresión de DNMT3b	Sin LEI VPH negativo n=34		Sin LEI VPH positivo n=55		LEIGB VPH positivo n=58		CaCU n=9		Valor de p ^a
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	
Genotipos SNP-149C>T									0.59
CC	2 (8)	0 (0)	5 (13)	2 (13)	0 (0)	5 (12)	0 (0)	1 (14)	
CT	10 (42)	7 (70)	21 (54)	6 (37)	10 (59)	17 (42)	0 (0)	1 (14)	
TT	12 (50)	3 (30)	13 (33)	8 (50)	7 (41)	19 (46)	2 (100)	5 (72)	

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), CaCU (Cáncer cervicouterino), SNP (polimorfismo de un solo nucleótido).
a prueba de X²

Metilación de los promotores FHIT y MGMT y expresión de DNMT3B

En la tabla 6, se observa la frecuencia de metilación de promotores de los genes FHIT y MGMT por expresión de DNMT3B en cada grupo de estudio. Pacientes sin LEI VPH negativo presentaron una frecuencia de metilación para FHIT de 50% y de MGMT de 70% por expresión de DNMT3B, en pacientes sin LEI VPH positivo se observó una frecuencia de metilación para FHIT de 56% y para MGMT de 37%, en pacientes con LEIGB la frecuencia para FHIT fue de 58% y para MGMT de 54%, y en pacientes con CaCU la frecuencia para FHIT fue de 71% y para MGMT de 57%. No se observaron diferencias significativas en la metilación de los promotores de los genes FHIT ($p=0.77$) y MGMT ($p=0.24$) por expresión de la proteína DNMT3B.

Tabla 6. Frecuencia de metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT por expresión de la proteína DNMT3B en los grupos de estudios.

Expresión de DNMT3B	Sin LEI		Sin LEI		LEIGB		CaCU		Valor de p ^a
	VPH negativo		VPH positivo		VPH positivo				
	n=34		n=56		n=58		n=9		
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	
	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	n %	
Metilación FHIT	0.77								
No metilado	11 (46)	5 (50)	11 (28)	7 (44)	8 (47)	17 (42)	1 (50)	2 (29)	
Metilado	13 (54)	5 (50)	29 (72)	9 (56)	9 (53)	24 (58)	1 (50)	5 (71)	
Metilación MGMT	0.24								
No metilado	13 (54)	3 (30)	21 (53)	10 (63)	13 (76)	19 (46)	2 (100)	3 (43)	
Metilado	11 (46)	7 (70)	19 (47)	6 (37)	4 (24)	22 (54)	0 (0)	4 (57)	

LEI (Lesión escamosa intraepitelial), LEIGB (Lesión escamosa intraepitelial de grado bajo), CaCU (Cáncer cervicouterino).
a prueba de X²

Expresión de DNMT3B y SNP-149C>T

La tabla 7, muestra la asociación de expresión de la proteína DNMT3B con el SNP-149C>T a través de un modelo de regresión logística multivariado, no encontrando asociación de los genotipos CT (OR=0.68; IC95%= 0.22-2.10; p=0.51) y TT (OR=0.93; IC95%= 0.29-2.91; p=0.91) ajustado por edad y menopausia.

Tabla 7. Asociación de la expresión de la enzima DNMT3B con el polimorfismo -149C>T.

Variables	OR (IC 95%)	Valor de p	Ajustado*	
			OR (IC 95%)	Valor de p
Genotipos				
CC	1		1	
CT	0.66 (0.21-2.03)	0.48	0.68 (0.22-2.10)	0.51
TT	0.90 (0.29-2.75)	0.85	0.93 (0.29-2.91)	0.91

*OR ajustado por edad y menopausia en un modelo de regresión logística.
IC (Intervalo de confianza).

En la tabla 8, se muestra un análisis de regresión logística multivariado, asociando la expresión de la proteína DNMT3B con las diferentes lesiones y las categorías de riesgo viral. Se observó una asociación entre el grupo de pacientes con LEIGB (OR=6.06; IC95%=2.32-15.86; p<0.01) y CaCU (OR=9.28; IC95%=1.49-57.57; p=0.01) con la expresión de la proteína DNMT3B. En cuanto a las categorías de riesgo viral se observó una asociación entre la infección por virus del papiloma

humano de alto riesgo (VPH-AR) (OR=2.89 IC95%=1.21-6.92; $p=0.01$) con la expresión de la proteína DNMT3B.

Tabla 8. Asociación de la expresión de la proteína DNMT3B con los grupos de lesiones y riesgo viral.

Variables	OR (IC 95%)	Valor de p	Ajustado*	
			OR (IC 95%)	Valor de p
Lesión				
Sin LEI VPH negativo	1		1	
Sin LEI VPH positivo	0.96 (0.37-2.45)	0.93	0.93 (0.35-2.50)	0.89
LEIGB VPH positivo	5.79 (2.28-14.66)	<0.001	6.06 (2.32-15.86)	<0.01
CaCU	8.4 (1.48-47.67)	0.01	9.28 (1.49-57.57)	0.01
Riesgo viral				
Negativo	1		1	
Bajo riesgo	0.96 (0.16-5.79)	0.96	1.02 (0.17-6.32)	0.98
Alto riesgo	2.76 (1.19-6.38)	0.01	2.89 (1.21-6.92)	0.01
Riesgo no determinado	4.8 (0.38-59.139)	0.22	5.15 (0.40-65.13)	0.20
VPH X	2.1 (0.59-7.36)	0.25	2.43 (0.68-8.71)	0.17

*OR ajustado por edad y menopausia en un modelo de regresión logística.
IC (Intervalo de confianza).

En la tabla 9, se analizó la relación entre la expresión de la proteína DNMT3B con la metilación del promotor de FHIT y MGMT a través de un modelo de regresión logística multivariado; no se encontró asociación entre la metilación del promotor de FHIT con la expresión de DNMT3B (OR=0.76; IC95%=0.38-1.50; $p=0.42$). Respecto a la asociación de la expresión de DNMT3B con la metilación del promotor de MGMT, tampoco se observó asociación con significancia estadística entre estas variables (OR=1.67; IC95%=0.86-3.24 $p=0.13$), aunque cabe resaltar que en este caso se observa una tendencia significativa entre la expresión de DNMT3B y la metilación del promotor de MGMT.

Tabla 9. Asociación de la expresión de la enzima DNMT3B con metilación de los promotores de FHIT y MGMT en la población estudiada.

Variables	Ajustado*			
	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	Valor de <i>p</i>
Metilación de FHIT				
Negativo	1		1	
Positivo	0.83 (0.44-1.57)	0.57	0.76 (0.38-1.50)	0.42
Metilación de MGMT				
Negativo	1		1	
Positivo	1.6 (0.85-2.99)	0.14	1.67 (0.86-3.24)	0.13

*OR ajustado por edad y menopausia en un modelo de regresión logística.
IC (Intervalo de confianza).

IV.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Está demostrado que la infección por VPH es etiológica en el desarrollo de CaCU; sin embargo, se requieren otros factores que favorezcan la progresión de las lesiones proliferativas típicas del virus hacia los estados de malignidad, tales como eventos genéticos y epigenéticos. Entre los eventos epigenéticos se encuentra la metilación de DNA, que se ha reportado que tiene un importante papel en el desarrollo y progresión de varios cánceres. La metilación del DNA es catalizada por un grupo de DNMTs, específicamente DNMT1 denominada como de mantenimiento, DNMT3a y DNMT3B denominadas de *novo* (Lin *et al.*, 2006; Hermann *et al.*, 2004; Yanagisawa *et al.*, 2002).

El gen DNMT3B posee polimorfismos que pueden estar implicados de manera importante en la carcinogénesis, como lo es el SNP-149C>T. Se ha reportado que este polimorfismo aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de varios cánceres, como el cáncer de pulmón, próstata y leucemia aguda. Aunado a esto, la expresión de la DNMT3B, se ha observado en varios tipos de cánceres como el de pulmón, riñón, páncreas, mama, próstata y colorrectal, proporcionando evidencias de su importante papel en el desarrollo del cáncer (Lin *et al.*, 2005). Otras evidencias muestran que la expresión de la proteína DNMT3B lleva a la metilación de promotores de genes, la cual se asocia con la disminución de su expresión (Shen *et al.*, 2002). Sin embargo, el mecanismo de su participación en el silenciamiento epigenético de muchos genes no está del todo claro.

En la presente investigación, estudiamos la relación del SNP-149C>T con la expresión de DNA metiltransferasa 3B y metilación de promotores de los genes FHIT y MGMT en mujeres sin LEI VPH negativas y positivas, con LEIGB y CaCU.

Hasta el momento, no existe algún reporte que relacione estos tres eventos en presencia de infección por VPH. En este estudio no se encontró una diferencia significativa entre los genotipos del SNP-149C>T de la DNMT3B y el grado de lesión ($p=0.36$), estos datos sugieren que una mujer con el SNP-149C>T no tiene mayor susceptibilidad al desarrollo de LEIGB y CaCU, a diferencia de lo encontrado por Shen *et al.* (2002) quienes muestran la primera evidencia de que el SNP-149C>T particularmente portadores del alelo T, se encuentra asociado significativamente con

un aumento en el riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón en una población no hispana de 319 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón. Sin embargo, en una investigación realizada por Fan *et al.* (2008) en 137 pacientes con cáncer de colon en una población china, no reportan diferencias significativas entre los controles y los pacientes con cáncer de colon respecto al SNP-149C>T, lo cual indica que en un individuo con el SNP-149C>T no aumenta la susceptibilidad para el desarrollo de cáncer de colon en la población que estudiaron. Por otra parte, un estudio realizado por Lee *et al.* (2005), en el que investigaron la influencia de varios polimorfismos del gen DNMT3B en el desarrollo de cáncer de pulmón, excluyen el SNP-149C>T porque argumentan no haberlo detectado en la población que estudiaron, debido posiblemente a las diferencias genéticas en las distintas poblaciones, lo cual podría explicar el resultado en el presente trabajo.

La frecuencia de expresión de la proteína DNMT3B mostró una diferencia significativa en relación con LEIGB y CaCU ($p < 0.001$), comprobando que la expresión de la proteína DNMT3B es frecuente en LEIGB y CaCU. Estos resultados son consistentes con los publicados por Lin *et al.* (2005) trabajo en el que los autores sugieren que la expresión de la enzima DNMT3B puede ser promovida por la infección de VPH (tipos 16 y 18) en una población Taiwanesa de 57 pacientes con cáncer de pulmón llevando a la metilación del promotor de p16INK4a (< 0.001).

Se ha mostrado que el SNP-149C>T del gen DNMT3B incrementa la susceptibilidad para el desarrollo de varios cánceres, así como también se ha reportado la expresión de la proteína DNMT3B en diversos cánceres. En el presente estudio no encontramos diferencias significativas entre el SNP-149C>T en relación con la expresión de la proteína DNMT3B en la carcinogénesis cervical, ya que no arrojó algún valor significativo ($p = 0.59$), siendo opuesto a lo que propone Shen *et al.* (2002) quién muestra una asociación entre el genotipo heterocigoto del SNP-149C>T de DNMT3B y el desarrollo de cáncer de pulmón, sugiriendo que la transición de C a T aumenta el nivel de expresión del gen DNMT3B. La diferencia en el tamaño de la muestra, podría explicar la discrepancia entre nuestros resultados y el estudio realizado por Shen *et al.* (2002), ya que ellos analizaron una población que constaba de 319 casos y 340 controles.

Estudios previos muestran que la metilación del promotor de varios genes es un evento que se presenta en lesiones precursoras de CaCU y la frecuencia incrementa conforme el grado de lesión. Nosotros encontramos que el 53% de las muestras sin LEI VPH negativo presentó metilación del promotor de FHIT a diferencia de Hernández *et al.* (2004) que detectaron 37.5%. En LEIGB detectamos metilación en el 57% de las muestras mientras que Hernández *et al.* (2004) detectaron una metilación de 46.1% de las muestras. La frecuencia de metilación en CaCU para FHIT fue de 67%, Hernández *et al.* (2004) previamente reportaron 53.6%.

En lo que se refiere al promotor de MGMT, se encontró que en muestras sin LEI VPH negativo, el 53% presentó metilación a diferencia de los encontrado por Hernández *et al.* (2004) que observaron el 17.5% de metilación. En LEIGB se observó metilación de MGMT en el 45% y Hernández *et al.* (2004) reporta el 37.5%. La frecuencia de metilación en CaCU para este gen en nuestro estudio fue del 44%, Hernández *et al.* (2004) reportó el 36.6%. Es importante resaltar que el número de muestras de pacientes sin LEI VPH negativo, en el estudio realizado por Hernández *et al.* (2004) fue de 40 y de CaCU 41, lo que tal vez explique la discrepancia entre sus resultados y los nuestros. Dichas diferencias también podrían ser explicadas en función a la metodología utilizada, ya que ellos realizaron la modificación con bisulfito de sodio de manera manual y nosotros la realizamos utilizando un Kit de metilación de ADN EZ de Zymo Research que tiene una elevada eficiencia y permite recuperar gran cantidad de DNA.

La metilación de *novo* de islas CpG de promotores puede llevar al silenciamiento de genes supresores de tumor (FHIT) y genes reparadores de daño al DNA (MGMT) (Lee *et al.*, 2005). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de DNMT3B y la frecuencia de metilación de FHIT ($p=0.77$) y MGMT ($p=0.24$) en LEIGB Y CaCU.

En conclusión, no encontramos asociación entre el SNP-149C>T con el riesgo para el desarrollo de LEIGB y CaCU. Sugerimos que dicho polimorfismo no influye en la expresión de la proteína DNMT3B, pero la expresión es mas frecuente en LEIGB y CaCU a diferencia de pacientes que no presentan infección por VPH y LEI. Respecto a la metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT en LEIGB y CaCU,

nuestros resultados concuerdan con estudios previos, reportando que la metilación es un evento temprano en el desarrollo de CaCU.

Este es el primer estudio que relaciona el SNP-149C>T con la expresión de la proteína DNMT3B y la metilación de los promotores de los genes FHIT y MGMT en lesiones precursoras y CaCU, sugiriendo que la expresión de la proteína DNMT3B puede ser promovida por la LEIGB y CaCU, pero no contribuir en la metilación de los promotores de FHIT y MGMT. Es importante mencionar que el número de muestras de LEIGA es demasiado pequeño, por lo que es necesario que se realicen estudios más amplios que relacionen estos tres eventos en lesiones precursoras y CaCU.

V.REFERENCIAS

- Ausbel, FM., Brent, R., Kingston, RE., Moore, DD., Seidman, JG., Smith, JA., *et al.* (2000). Preparation and analysis of DNA: Restriction endonucleases. *Current Protocols in Molecular Biology*, 3.1.1 – 3.1.3, 3.1.10 – 3.1.17.
- Badal, S., Badal, V., Calleja-Macías, IE., Kalantari, M., Chuang, LSH., Li, BFL., *et al.* (2004). The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Journal of Virology*, 324, 483-492.
- Badal, V., Chuang, LSH., Tan, EH-H., Badal, S., Villa, LL., Wheeler, CM., *et al.* (2003). CpG Methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of Virology*, 77, 6227-6234.
- Balderas-Loaeza, A., Anaya-Saavedra, G., Ramírez-Amador, VA., Guido-Jiménez, MC., Kalantari, M., Calleja-Macias, IE., *et al.* (2007). Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *International Union Against Cancer*, 120, 2165-2169.
- Bernard, HU., Chan, SY., Manos, MM., Ong, CK., Villa, LL., Delius, H., *et al.* (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170, 1077-1085.
- Bosch, FX., Manos, MM., Muñoz, N., Sherman, M., Jansen, AM., Peto, J., *et al.* (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of National Cancer Institute*, 87, 796-802.
- Burd, EM. (2003). Human papilloma and cervical cancer. *Clin Microbiology Reviews*, 16(1), 1-17.
- Burgers, WA., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., Fuks, F. (2007). Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Nature*, 26, 1650-1655.
- Butler, D., Collins, C., Mabruk, M., Walsh, BC., Leader, BM., Kay WE. (2000). Deletion of the FHIT gene in neoplásica and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features. *Journal of Pathology*, 192, 502-510.
- Butler, D., Collins, C., Mabruk M., Leader, B., Kay, W. (2002). Loss of FHIT expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer. *Gynecologic Oncology*, 86, 144-149.
- Cairns, Paul. (2007) Gene methylation and early detection of genitourinary cancer the road ahead. *Nature*, 7, 531-541.
- Calleja-Macías, IE., Kalantari, M., Allan, B., Williamson, AL., Chung, LP, Collins, RJ., *et al.* Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus type 44 and 55 and 68a and-b. *Journal of Virology*, 79, 6565.

Castellsagué, X., Díaz M., de Sanjosé, S., Muñoz, N., Herrero, R., Fransceschi, S., *et al.* (2006). Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 303-314.

Castro Coronel Y. Expresión de los genes MGMT y FHIT en lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino [tesis de maestría]. Chilpancingo Guerrero: Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Unidad Académica de Medicina, Universidad Autónoma de Guerrero; 2005.

Cogliano, V., Baan, R., Straif, K., Grosse Y., Secretan, B. (2005). Carcinogenicity of human papillomavirus. *Lancet Oncology*, 6, 204.

Clifford, GM., Smith, JS., Plummer, M., Muñoz, N., Franceschi, S. (2003). Papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 8, 63–73.

Danam, R., Howell, S., Brent, t., Harris, L. (2005) Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(1), 61–69.

de Sanjosé, S., Díaz M., Castellasague, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., *et al.* (2007). Worlwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 7, 453.

de Villiers, EM., Fauquet, C., Broker, TR., Bernard, HU., Zur Hausen ,H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Journal of Virology*, 324, 17-27.

Doorbar John. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32S, 12S-S13.

Esteller, M., Hamilton, S., Burger, P., Baylin, S., Herman, J. (1999). Inactivation of the DNA repair gene O⁶ –methyltranferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplásica. *Cancer Research*, 59, 793-797.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-59.

Fan, H., Zhang, F., Hu, J., Liu, D., Zhao Z. (2008). Promoter polymorphisms of DNMT3b and the risk of corrorectal cancer in Chinese: a case-control study. *BioMed Central*, 27, 1-6.

Fang, JY., Cheng, ZH., Chen, YX., Lu, R., Yang, L., Zhu, HY., *et al.* (2004). Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 3394-3398.

Franceschi, S., Herrero, R., Clifford, GM., Snijders, PJF., Arslan, A., Anh, PTH., *et al.* (2006). Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *International. Journal of Cancer*, 119, 2677-2684.

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., Bestor, T.H. (2006). Methylation of tarnasp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759), 395-398.

González-Losa, MR., Rosando-López, I., Valdez-González N., Puerto-Solís, M. (2004). High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *Elsevier*, 29, 202-205.

Gowher, H., Jeltsch, A. (2002). Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 20409-20414.

Henken, F., Wilting, S., Overmeer, R., Rietschoten, J., Nygren, A., *et al.* (2007). Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 97, 1457-1464.

Hermann, A., Gowher, H., Jeltsch, A. (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular Molecular Life Sciences*, 61, 2571-2587.

Hernández Sótelo D. Metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT en cáncer cervical y lesiones precancerosas [tesis de maestría]. Chilpancingo Guerrero: Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Unidad Académica de Medicina, Universidad Autónoma de Guerrero; 2004.

Hong, D., Ye, F., Chen, H., Lu, W., Cheng, Q., Hu, Y., *et al.* (2007). Distribution of human papillomavirus genotypes in the patients with cervical carcinoma and its precursors in Zhejiang Province, China. *International Journal Gynecologic Cancer*, 1-6.

Illades-Aguiar, B., Cortés-Malagón, EM., Antonio-Véjar, Verónica., Zamudio-López, Noelio., Alarcón-Romero, LC., Fernández-Tilapa, Gloria., *et al.* (2009). Cervical carcinoma in Southern Mexico: Human papillomavirus and cofactors. *Cancer Detection and Prevention*, 1-8.

Kent, W., Kelley, M. (2000). Review of Mammalian DNA Repair and Translational Implications. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295, 1-9.

Lacruz-Pelea, C. (2003). Nomenclatura de la lesiones cervicales (de Papanicolau a Bethesda 2001). *Revista Española de Patología*, 36, 5 – 10.

Lai, CH., Lin, YW., Huang, THM., Yan, P., Huang RL., Wang, HC., *et al.* (2008). Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 123, 161-167.

Lee, SJ., Jeon, HS., Jang JS., Park, SH., Lee, GY., Lee, BH., *et al.* (2005). DNMT3b polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 403-409.

Leornard, D., Michael, K., James, B. (1994). Basic methods in molecular biology. *Appleton & Lange*.

Lin, RK., Hsu, HS., Chang, JW., Chen, CY., Chen, JT., Wang YC. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5´CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*, 55, 205-213.

Lin, TS., Lee, H., Chen RA., Ho, ML., Lin, CY., Chen, YH., *et al.* (2005). An association of DNMT3b protein expression with p16^{INK4a} promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Letters*, 226, 77-84.

López-Revilla, R., Martínez-Contreras, LA., Sánchez-Garza, M. (2008). Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplásica and invasive carcinoma. *BioMed Central*, 1-13.

Liu, Y., Siegfried, J., Luketich, J., Keohavong, P. (2006). Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia*, 8, 46-51.

Molijn, A., Bernhard K., Wim, Q., Lee-Jan., VD. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, 32, 43 – 51.

Moscicki, AB., Schiffman, M., Kjaer, S., Villa, LL. (2006). Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*, S3, 42-51.

Mori, M., Mimori, K., Masuda, T., Yoshinaga, K., Yamashita, K., Matsujama, A., *et al.* (2001) Absence of Msh2 protein expression is associated with alteration in the FHIT locus and FHIT protein expression in colorectal carcinoma. *Cancer Research*, 61, 7379-82.

Muñoz, N., Castellsagué, X., de González AB., Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cáncer. *Vaccine*, S3, 1-10.

Palacio-Mejía, LS., Rangel-Gómez, G., Hernández-Avila, M., Lazcano-Ponce, E. (2003). Cervical cáncer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Pública Mexico*, 45, S3, 15-25.

Sard, L., Accorhero. P., Torielli, S., Delia, D., Bunone, G., Campiglio, M., *et al.* (1999). The tumor suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8489-92.

Secretaría de Salud. Dirección General de Información en Salud. México 2006. Available from URL: <http://sinais.salud.gob.mx/>[Lastaccessed:2007May8].

Sen, E., Alam, S., Meyers C. (2004). Genetic and Biochemical Analysis of cis Regulatory Elements within the Keratinocyte Enhancer Region of the Human Papillomavirus Type 31 Upstream Regulatory Region during Different Stages of the Viral Life Cycle. *Journal of Virology*, 612-629.

Shen, H., Wang, L., Spitz, MR., Hong, WK., Mao, L., Wei, Q. (2002). A novel polymorphism in human cytosine DNA-Methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Research*, 62, 4992-4995.

Snijders, P., Steenbergen, R., Heideman, D., Meijer, C. (2006). HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *Journal of Pathology*, 208, 152-164.

Steben, M., Duarte-Franco, E. (2007). Human papillomavirus infection: Epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic Oncology*, 107, S2-S5.

Strauss, WM. (2000). Preparation and analysis of DNA: preparation of genomic DNA from mammalian tissue. *Current protocols in Molecular Biology*, 2.2.1-2.2.3.

Tirado-Gómez, LL., Mohar-Betancourt., A., López-Cervantes, M., Garcia-Carrancá, A., Franco-Marina, F., Borges, Guilherme. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas. *Salud Pública Mexico*, 47, 342-350.

Turan, T., Kalantari, M., Calleja-Macías, IE., Cubie, HA., Cuschieri, K., Villa, LL., *et al.* (2006). Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: A biomarker of neoplastic progression? *Virology*, 349, 175-183.

Virmani, A., Muller, K., Rathi, A., *et al.* (2001). Aberrant Methylation during Cervical Carcinogenesis. *Clinical Cancer Research*, 7, 584-589.

Walboomers, JM., Jacobs, MV., Manos, MM., Bosch, FX., Kummer, JA., Shah, KV., *et al.* (1999). Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189, 9-12.

Woodman, CBJ., Collins, SI., Young, LS. (2007). The natural history of cervical HV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*, 7, 11-20.

Yanagisawa, Y., Ito, E., Yuasa, Y., Maruyama, K. (2002). The human DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B have two types of promoters with different CpG contents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577, 457-465.

Zur Hausen H. (2002). Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2, 342 – 350.

Zöchbauer-Müller, S., Fong, K., Maitra, A., Lam, S., Geradts, J., Ashfaq, R., Virmani, A. (2001). 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Research*, 61, 3581-3585.