



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

**“METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE LOS GENES
MGMT Y FHIT EN CÁNCER CERVICAL Y LESIONES
PRECANCEROSAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. BERENICE ILLADES AGUIAR

CHILPANCINGO, GRO., DICIEMBRE DE 2004.

**Metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT en
cáncer cervical y lesiones precancerosas**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Trabajo financiado por el Fondo Mixto CONACIY-Gobierno del Estado de Guerrero, clave: GUE-2002-C01-6523

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de forma especial a mi directora de tesis, Dra. Berenice Illades Aguiar por la ayuda y el tiempo brindado para el desarrollo de este trabajo y además por sus regaños en los momentos precisos.

Agradezco también a mis asesores, Dr. Saúl López Silva, Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dra. Mónica Espinoza Rojo y la M en C. Ma. Elena Moreno Godínez por sus importantes aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

Dedico mi trabajo a mis padres y hermanos.

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	i
Indice de cuadros	ii
Indice de figuras	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	3
III. RESULTADOS	5
IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES	10
V. REFERENCIAS	13

ABREVIATURAS

VPH	Virus del papiloma humano
LEIBG	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
LEIAG	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
HIT	Triada de histidinas
CaCU	Cáncer cervico uterino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	Restricción de fragmentos polimórficos
PCR-SM	PCR sensible a metilación

INDICE DE CUADROS

	Página
<i>Cuadro I.</i> Edad promedio y positividad al VPH estratificada por el tipo de lesión.	6
<i>Cuadro II.</i> Frecuencia de los genotipos de VPH estratificada por el tipo de lesión.	7
<i>Cuadro III.</i> Frecuencia de metilación aberrante de los genes MGMT y FHIT durante la carcinogénesis cervical.	7
<i>Cuadro IV.</i> Riesgo de LEIBG y cáncer cervical por presencia de metilación del promotor de MGMT y FHIT.	8
<i>Cuadro V.</i> Frecuencia de los genotipos de VPH y metilación de los promotores de MGMT y FHIT estratificada por el tipo de lesión.	9

INDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> PCR-SM de MGMT en muestras de DNA cervical.	5
<i>Figura 2.</i> PCR-SM de FHIT en muestras de DNA cervical.	5

RESUMEN

Objetivo. Analizar el estado de metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT, en tejido cervical normal, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y cáncer cervical invasor. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio transversal analítico, en el que las muestras se capturaron de mayo de 1997 a diciembre de 2003 en el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco Guerrero. La detección de la metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación, previa modificación con bisulfito de sodio. Las asociaciones entre las variables fueron establecidas usando la prueba exacta de Fisher o χ^2 . **Resultados.** Se analizaron 121 muestras: 40 de citología normal, 39 de LEIBG, 1 de LEIAG y 41 de cáncer cervical. En citología cervical normal se detectó metilación de los promotores de los genes MGMT (17.5%) y FHIT (37.5%). La frecuencia de metilación en FHIT fue mayor en cáncer cervical invasor que en LEIAG, LEIBG y citología normal cervical. Cerca del 27% de los casos de CaCU y el 23% de los de LEIBG presentaron metilación en los dos genes. Las mujeres que presentaron metilación en MGMT y FHIT mostraron mayor riesgo de desarrollar LEIBG (OR de 5.7, IC a 95% de 1.04-56.9) y cáncer cervical (OR de 6.9, IC a 95% de 1.33-67.9) que las que no presentaron metilación en ambos genes. **Conclusiones.** La metilación del promotor de los genes MGMT y FHIT es un evento temprano de la carcinogénesis cervical. Aunque los resultados de este estudio deben ampliarse, los patrones de metilación aberrantes en las mujeres con citología normal y LEIBG podrían ser útiles para identificar a subgrupos con mayor riesgo de progresión a cáncer cervical invasor.

ABSTRACT

Aim. Analyze the methylation status of the promoters of the MGMT and FHIT genes in normal cervical cancer, low grade squamous intraepithelial lesion (LGSIL), high grade squamous intraepithelial lesion (HGSIL) and invasive cervical cancer. **Materials and methods.** An analytical transversal study was carried out, in which the samples were collected from May, 1997 to December, 2003 in the Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán” in Acapulco, Guerrero. The detection of methylation of the promoters of the MGMT and FHIT genes was done by methylation sensitive polymerase chain reaction with a previous modification with sodium bisulfite. The associations between variables were established using the exact Fisher test or X^2 . **Results.** 121 samples were analyzed: 40 of normal cytology, 30 of LGSIL, 1 of HGSIL and 41 of cervical cancer. In the normal cervical cytology, methylation was detected in the promoters of the MGMT (17.5%) and FHIT (37.5%) genes. The frequency of methylation in FHIT was higher in invasive cervical cancer than in LGSIL, HGSIL and normal cervical cytology. Around 27% of the cases of cervical cancer and 23% of the LGSIL showed methylation on both genes. The women that presented methylation in MGMT and FHIT showed a higher risk of developing LGSIL (OR of 5.7, IC 95% of 1.04-56.9) and cervical cancer (OR of 6.9, IC 95% of 1.33-67.9) than those in which both genes were not methylated. **Conclusions.** The methylation of the promoter of the MGMT and FHIT genes is an early event in cervical carcinogenesis. Even though these results have to be expanded, the aberrant patterns of methylation in women with normal cytology and LGSIL can be useful in the identification of subgroups with higher risk of progression into invasive cervical cancer.

INTRODUCCION

El cáncer cérvico uterino es el segundo cáncer más frecuente a nivel mundial, en países en desarrollo es el más común ²⁵ y en los Estados Unidos es la tercera malignidad ginecológica. Estudios epidemiológicos y experimentales muestran que la infección con el virus del papiloma humano (VPH) es frecuente en la neoplasia intraepitelial cervical y en cáncer cervical invasor (99.7% de los carcinomas de cervix y el 76.7% de los adenocarcinomas contienen DNA del VPH). ^{13, 31, 35} Existe una fuerte asociación entre los genotipos de alto riesgo del VPH y el carcinoma cervical. Los productos de los genes E6 y E7 del VPH 16 y 18, son importantes durante las etapas iniciales de la transformación e inmortalización maligna. La inactivación de los productos de los genes *p53* y *Rb* por las proteínas E6 y E7 respectivamente, es un paso importante para mantener la proliferación celular anormal, ya que mediante este proceso se afectan dos puntos importantes de restricción del ciclo celular. ³³ Además de la infección por el VPH, es claro que otros factores están involucrados en la carcinogénesis cervical, considerando que la mayoría de las pacientes con lesiones cervicales asociadas a VPH no progresan a cáncer cervical invasor, ⁶ por lo que es necesario identificar otros eventos tanto genéticos como epigenéticos involucrados en el origen y desarrollo de cáncer cervicouterino.

En la génesis del cáncer, incluido el cervical, genes supresores de tumor y genes reparadores de DNA son inactivados por medio de mecanismos como: mutaciones puntuales, eliminaciones cromosomales y silenciamiento epigenético. ³¹ La metilación es un evento epigenético frecuente, está involucrada de forma normal en la inactivación del cromosoma X en las mujeres, en el desarrollo normal e imprinting. ^{5, 9} En cambio se ha encontrado metilación anormal de islas CpG presentes en promotores de genes reparadores como MGMT y supresores de tumor como FHIT, *p16*, VHL, *E-caderina*, APC y *hMLH1* bajo ciertas condiciones patológicas. ^{16, 15} Además, la hipermetilación anormal de genes es un mecanismo importante para el silenciamiento genético en diversos tipos de tumores humanos. ³²

El gen MGMT se localiza en el cromosoma 10q26, codifica para una proteína reparadora del DNA que elimina por reversión directa, grupos alquilo del O⁶ de la guanina, con lo que previene la generación de mutaciones debido a la tendencia de la O⁶ alquilguanina de aparearse con la timina durante la replicación del DNA, resultando en la conversión de pares G-C a pares A-T. ^{17, 27} La proteína MGMT protege a las células contra estas lesiones, transfiriendo el grupo alquilo del O⁶ de la guanina en el DNA a la cisteína 145 presente en una región conservada de la proteína (PCHRV). Esta reacción inactiva una molécula de MGMT por cada lesión reparada. ²¹ En algunos tipos de cáncer se ha observado que la expresión del gen

MGMT se encuentra disminuida o se pierde, pero estos eventos no se deben a eliminaciones, mutaciones, rearrreglos o inestabilidad del RNAm, por lo que mecanismos epigenéticos como la metilación podrían estar involucrados.^{17 y 28}

El gen FHIT se encuentra en el cromosoma 3p14.2. La proteína 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) las cuales 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.¹² Por otro lado, aunque la función de la proteína FHIT y su papel como supresor de tumor no está del todo determinado, se le ha propuesto como tal, en base a su frecuente pérdida de alelos, eliminaciones homocigóticas y a que en varios tipos de cáncer se ha encontrado transcripción aberrante de este gen.²⁹ El gen FHIT traslapa con uno de los sitios frágiles más comunes, el FRA3B, por lo que la pérdida de FHIT puede ser explicada por esta razón.¹¹ Se ha observado que la expresión de FHIT es reducida en distintos tipos de cáncer, principalmente en tumores con pérdida de la heterocigocidad en 3p14. En los alelos mantenidos las alteraciones genéticas se observan raramente, sin embargo, puede notarse la disminución en la expresión de la proteína FHIT,²³ por lo que la metilación podría ser la causante de su baja expresión.²

En la carcinogénesis cervical el papel de la inactivación epigenética de los genes supresores de tumor y reparadores de DNA está poco entendido. Además de que existen pocos estudios publicados que analizan la metilación de promotores de genes específicos en el cáncer cervical y lesiones precursoras, sus resultados son divergentes, por lo que es necesario ampliar el estudio de la metilación de los promotores de ciertos genes en este tipo de cáncer.^{28, 31, 34}

En base a estas observaciones, nosotros analizamos el estado de metilación de los genes MGMT y FHIT, por PCR-SM (reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación), en tejido normal, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y cáncer cervical invasor.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio transversal analítico, en donde se incluyeron muestras de mujeres que asistieron a realizarse el examen de Papanicolaou y a la clínica de lesiones tempranas al Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco Guerrero, de mayo de 1997 a diciembre de 2003, sin antecedentes de terapia antineoplásica. Las pacientes incluidas firmaron una carta de consentimiento informado.

Colección de Muestras, Extracción y Purificación del DNA. Se colectaron muestras de raspado cervicovaginal para obtener los casos de citología cervical normal y biopsias para obtener los casos de lesiones precancerosas y cáncer cervical. A partir de los raspados cervicales se realizó el diagnóstico citológico y de las biopsias cervicales el diagnóstico histológico. De ambos tipos de muestras se realizó la extracción de DNA y el análisis de la presencia de VPH. El diagnóstico citológico e histológico fue interpretado por personal calificado del Instituto Estatal de Cancerología, en base al sistema de Bethesda. Se estudiaron un total de 121 muestras cuya distribución fue la siguiente: 41 casos de cáncer cervico uterino (CaCU), 1 caso de LEIAG, 39 casos de LEIBG y 40 casos de citología normal. En ambos tipos de muestras la extracción de DNA se realizó con fenol/cloroformo, previa digestión con proteinasa K y precipitación con etanol, según el método establecido por Sambrook.³⁰ La medición de la pureza y concentración del DNA se realizó por espectrometría UV (BioPhotometer, Eppendorf).

PCR y RFLP para el VPH. En todas las muestras se determinó la presencia del DNA de VPH por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con los iniciadores MY11 y MY09.^{3,4} La mezcla de PCR incluyó, buffer de PCR Gold 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.6 mM de deoxinucleótidos trifosfato, 0.8 μM de cada iniciador, 1.25 U de ampli taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y ~1μg de DNA cervical. La PCR se llevó a cabo en termociclador modelo 2400 (Applied Biosystems), la temperatura de alineamiento fue a 54 °C. Como control positivo se usó DNA plasmídico con VPH 16 y como control negativo H₂O. La genotipificación se realizó por restricción de fragmentos polimórficos (RFLPs),⁷ con el uso de 7 enzimas de restricción: *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fl, *Pst*I, *Rsa*I y *Sau*3AI (Gibco BRL). Los productos de PCR y las restricciones fueron analizados en gel de agarosa (Invitrogen) al 1.5 y 2.5% respectivamente, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

Modificación con bisulfito de sodio. La modificación fue realizada como lo reportó Herman y *col.* Brevemente, se desnaturalizaron 4 μg de DNA en volumen de 50 μl con NaOH (concentración final 0.2 M) por 10 min a 37 °C, se adicionaron 30 μl de hidroquinona (Sigma-Aldrich Co.) 10 mM y 520 μl de bisulfito de sodio (J.T. Baker) 3 M a pH 5, ambos recién preparados, posteriormente la mezcla fue

incubada bajo aceite mineral por 16 h a 50 °C. El DNA modificado fue purificado con Wizard DNA Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI) y eluido en 50 µl de H₂O. La modificación finalizó con la adición de NaOH (concentración final 0.3 M) por 5 min a temperatura ambiente, seguido de la precipitación con etanol, finalmente el DNA se resuspendió en 20 µl de H₂O desionizada estéril.²² Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

PCR-SM. El estado de metilación de los genes MGMT y FHIT fue determinado mediante PCR-SM (PCR sensible a metilación) en un termociclador modelo 2400 (Applied Biosystems). Los iniciadores para el gen MGMT fueron: sentido, 5' TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT, antisentido, 5'AACTCCACACTCTTCCAAAAACA- AAACA, para secuencias no metiladas y para secuencias metiladas el sentido 5' TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCG, antisentido, 5' GCACTCTTCCGAAAACGAAACG.¹⁷ Para el gene FHIT los iniciadores fueron: el sentido 5' TTGGGGTGTGGGTTTGGGTTTTTATG, antisentido, 5' CATAAACAACACCAACCCCACTA, para secuencias no metiladas y el sentido, 5' TTGGGGCGCGGGTTTGGGTTTTTACGC, antisentido, 5' CGTAAACGACGCCGACCCCACTA para secuencias metiladas.³⁶ La mezcla de PCR para los dos genes incluyó, buffer de PCR Gold 10X (concentración final 1.5X), MgCl₂ (concentración final 2 mM), deoxinucleótidos trifosfato (concentración final 1 mM), iniciadores (concentración final 0.8 µM), 1.25 U de ampli taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y ~1µg DNA modificado con bisulfito de sodio. Las reacciones de PCR-SM de los genes MGMT y FHIT se llevaron a cabo en 40 ciclos bajo las siguientes condiciones, desnaturalización a 95 °C, alineamiento a 59 °C (MGMT metilado y no metilado), 64 °C y 61 °C (FHIT metilado y FHIT no metilado, respectivamente) y extensión a 72 °C, todos por 30 s, con un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 10 min y uno final de extensión a 72 °C por 8 min. Como control positivo para las secuencias no metiladas se usó DNA de leucocitos humanos de sangre periférica y como control positivo para secuencias metiladas, DNA de leucocitos humanos tratado con SssI metiltransferasa (New England BioLabs, Inc.). Como controles negativos se incluyeron muestras sin DNA en cada PCR-SM realizada. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa (Invitrogen) al 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

Análisis de datos. El análisis estadístico se realizó con el programa STATA 6.0. Las asociaciones entre las variables se hicieron mediante la prueba exacta de Fisher o χ^2 . Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se analizó el estado de metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT en 40 especímenes de tejido normal cervical, 39 de LEIBG, 1 de LEIAG y 41 de cáncer cervical invasor. En la figura 1 y 2 se muestran ejemplos representativos de los productos de PCR-SM, analizados en geles de agarosa, para los genes MGMT y FHIT. En el cuadro I se presenta la distribución de la edad de la población estudiada de acuerdo al grado citológico e histológico, así como la prevalencia del VPH detectada por PCR. Se observó que las pacientes con cáncer cervical invasor eran de mayor edad en comparación con los otros grupos. Entre las pacientes con citología normal y LEIBG la media de la edad fue igual y el rango de edad muy similar.

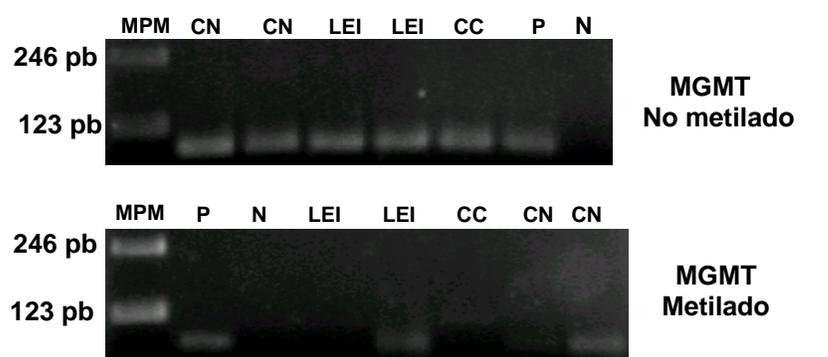


Figura 1. PCR-SM de MGMT en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; CN, células cervicales normales; LEI, lesión escamosa intraepitelial; CC, cáncer cervical; P, control positivo y N, control negativo.

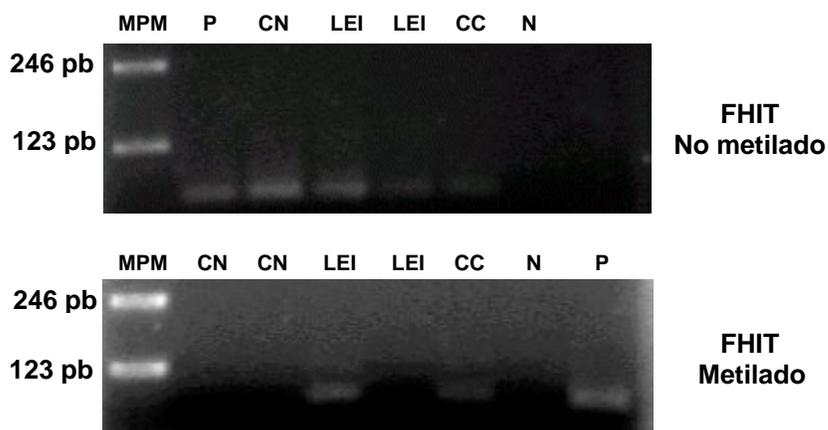


Figura 2. PCR-SM de FHIT en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; CN, células cervicales normales; LEI, lesión escamosa intraepitelial; CC, cáncer cervical; P, control positivo y N, control negativo.

Cuadro I

Edad promedio y positividad al VPH estratificada por el tipo de lesión				
Diagnóstico	n	VPH + %	Media años	Rango de edad
Citología normal cervical	40	50	34.3	18 – 68
LEIBG	39	97.5	34.3	18 – 70
LEIAG	1	100	39.0	–
Cáncer cervical invasor	41	100	49.9	30 – 73

El cuadro II muestra los genotipos de VPH detectados en los cuatro grupos diferentes de las muestras analizadas. En las muestras de citología normal, LEIAG y cáncer cervical el VPH tipo 16 fue el que se encontró con más frecuencia. En LEIBG el VPH más frecuente fue el tipo 33 seguido del VPH tipo 16 y el 12.8% de las muestras presentaron infección múltiple. En las citologías normales el 25% de las muestras presentaron VPH de alto riesgo. En LEIBG, LEIAG y cáncer cervical todas las muestras que se genotipificaron fueron de VPH de alto riesgo.

En el cuadro III se concentran los resultados de la frecuencia de la metilación de MGMT y FHIT de forma independiente, juntos y uno u otro. Es notorio observar que en las citologías normales se detectó metilación en ambos genes (MGMT 17.5% y FHIT 37.5%). La frecuencia de metilación en FHIT resultó ser mayor en cáncer cervical invasor que en LEIBG, LEIAG y citología normal cervical, mientras que la frecuencia de metilación en MGMT fue más alta en cáncer cervical que en citología normal pero ligeramente más baja que en las lesiones precancerosas. El 50% de las citologías normales y el 61.5% de las LEIBG presentaron metilación para cualquiera de los genes estudiados. Cerca del 27% de los casos de CaCU presentaron metilación en los dos genes, a diferencia de las citologías normales en las que solo el 5% la presentaron.

Cuadro II

Frecuencia de los genotipos de VPH estratificada por el tipo de lesión				
Genotipos de VPH	Citología normal No. (%)	LEIBG No. (%)	LEIAG No. (%)	Cáncer cervical No. (%)
VPH 16	5 (12.5)	5 (12.8)	1 (100)	28 (68.3)
VPH 18		1 (2.5)		2 (4.9)
VPH 33		15 (38.5)		1 (2.4)
VPH 39	1 (2.5)			
VPH 45		2 (5.2)		1 (2.4)
VPH 52		3 (7.7)		
VPH 53	1 (2.5)			
VPH 58	3 (7.5)	3 (7.7)		3 (7.4)
VPH 59				1 (2.4)
VPH 61	1 (2.5)			
VPH 70	1 (2.5)			
VPH 81	1 (2.5)			
VPH IM	2 (5.0)	5 (12.8)		
VPH NC	5 (12.5)	5 (12.8)		5 (12.2)
Negativos	20 (50.0)			
Total	40 (100)	39 (100)	1 (100)	41 (100)
VPH alto riesgo ^a	10 (25.0)	29 (74.3)	1 (100)	36 (87.8)
VPH bajo riesgo ^b	3 (7.5)			

VPH IM, infección múltiple; VPH NC, VPH no caracterizado.

^aVPH alto riesgo: 16, 18, 33, 39, 45, 52, 53, 58 y 59. ²⁵

^bVPH bajo riesgo: 61, 70 y 81. ²⁵

Cuadro III

Frecuencia de metilación aberrante de los genes MGMT y FHIT durante la carcinogénesis cervical				
	MGMT No. (%)	FHIT No. (%)	MGMT o FHIT No. (%)	MGMT y FHIT No. (%)
Citología cervical normal (n = 40)	7 (17.5)	15 (37.5)	20 (50)	2 (5)
LEIBG (n = 39)	15 (38.5)	18 (46.1)	24 (61.5)	9 (23.1)
LEIAG (n = 1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Cáncer cervical (n = 41)	15 (36.6)	22 (53.6)	26 (63.4)	11 (26.9)

El riesgo de LEIBG y cáncer cervical por la metilación de MGMT y FHIT se muestra en el cuadro IV. En relación al riesgo de LEIBG y cáncer cervical, únicamente cuando fue evaluada la presencia de metilación en los genes MGMT y FHIT juntos se encontraron valores de OR significativos tanto para LEIBG como para cáncer cervical. Las mujeres que presentaron metilación en MGMT y FHIT mostraron mayor riesgo de desarrollar LEIBG (OR de 5.7 y IC a 95% de 1.04-56.9) y cáncer cervical (OR de 6.9 y IC a 95% de 1.33-67.9) que las que no presentaron metilación en ambos genes. En cuanto a la metilación de sólo MGMT y el riesgo de LEIBG y cáncer cervical existe una tendencia hacia la significancia, mientras que la metilación de sólo FHIT y la de MGMT o FHIT no se asociaron al desarrollo de LEIBG y cáncer cervical.

En el cuadro V se relaciona la frecuencia de los genotipos de VPH y la metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT. Todas las muestras de citología cervical normal y LEIBG con VPH tipo 16 no presentaron metilación en MGMT y FHIT, mientras que en cáncer cervical el 32.1% y 42.8% de las muestras con VPH tipo 16 presentaron metilación en MGMT y FHIT respectivamente. En todas las muestras de cáncer cervical con VPH tipo 18 encontramos metilación en MGMT y FHIT. El 60% de las muestras de LEIBG con VPH tipo 33 presentaron metilación en MGMT y el 66.7% en FHIT. En citología normal en ninguna de las muestras que se logró caracterizar al VPH se encontró metilación en MGMT.

Cuadro IV

Riesgo de LEIBG y cáncer cervical por presencia de metilación del promotor de MGMT y FHIT				
	MGMT OR (IC 95%)	FHIT OR (IC 95%)	MGMT o FHIT OR (IC 95%)	MGMT y FHIT OR (IC 95%)
LEIBG	2.9 (0.94 - 9.8)	1.4 (0.53 - 3.9)	1.6 (0.59 - 4.31)	5.7 (1.04 - 56.9)
Cáncer cervical	2.7 (0.87 - 9.0)	1.9 (0.72 - 5.1)	1.7 (0.65 - 4.6)	6.9 (1.33 - 67.9)

El grupo de citología cervical normal se usó como categoría de referencia

Cuadro V

Frecuencia de los genotipos de VPH y metilación de los promotores de MGMT y FHIT estratificada por el tipo de lesión

	MGMT (%)		FHIT (%)	
	M	NM	M	NM
Citología normal				
VPH 16 (n=5)	0	100	0	100
VPH 39 (n=1)	0	100	100	0
VPH 58 (n=3)	0	100	33.3	66.7
VPH 53 (n=1)	0	100	100	0
VPH 61 (n=1)	0	100	0	100
VPH 81 (n=1)	0	100	100	0
VPH 70 (n=1)	0	100	0	100
VPH IM (n=2)	0	100	50	50
VPH NC (n=5)	40	60	40	60
Negativos (n=20)	25	75	40	60
VPH alto riesgo ^a (n=10)	0	100	30	70
VPH bajo riesgo ^b (n=3)	0	100	33.3	66.7
LEIBG				
VPH 16 (n=5)	0	100	0	100
VPH 18 (n=1)	100	0	0	100
VPH 33(n=15)	60	40	66.7	33.3
VPH 45 (n=2)	50	50	50	50
VPH 52 (n=3)	0	100	66.7	33.3
VPH 58 (n=3)	33.3	66.7	0	100
VPH IM (n=5)	60	40	80	20
VPH NC (n=5)	0	100	20	80
VPH alto riesgo ^a (n=29)	41.4	58.6	44.8	55.2
LEIAG				
VPH 16 (n=1)	0	100	0	100
Cáncer cervical				
VPH 16 (n=28)	32.1	67.9	42.8	57.2
VPH 18 (n=2)	100	0	100	0
VPH 33 (n=1)	0	100	0	100
VPH 45 (n=1)	0	100	100	0
VPH 58 (n=3)	0	100	66.7	33.3
VPH 59 (n=1)	0	100	100	0
VPH NC (n=5)	80	20	80	20
VPH alto riesgo ^a	30.5	69.5	50	50

M, promotor metilado; NM, promotor no metilado; VPH IM, infección múltiple; VPH NC, VPH no caracterizado.

^aVPH alto riesgo: 16, 18, 33, 39, 45, 52, 53, 58 y 59. ²⁵

^bVPH bajo riesgo: 61, 70 y 81. ²⁵

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los estudios epidemiológicos y experimentales muestran que la presencia de VPH asociados a cáncer, así como su integración dentro del genoma celular son factores importantes en el desarrollo del cáncer cervical. Además, existe evidencia suficiente para decir que el VPH está implicado en la etiología de la carcinogénesis cervical.^{14, 26} Sin embargo, la mayoría de las pacientes con infección por el VPH no desarrollan cáncer invasor, por lo tanto, la infección por el VPH es insuficiente para completar la transformación maligna de las células cervicales, lo que sugiere la participación de eventos genéticos y epigenéticos en la génesis del cáncer cervical.²⁸ Se sabe que la acumulación de cambios moleculares lleva a la transformación de las células normales en displásicas y hacia carcinoma *in situ* y posteriormente a cáncer invasor.¹⁹ Sin embargo, la secuencia de eventos moleculares que suceden no está completamente establecida.

La metilación es una modificación epigenética esencial para el desarrollo de los mamíferos.⁸ Sin embargo, la metilación aberrante de promotores de genes reparadores y supresores de tumor ocasiona disminución de la expresión o silenciamiento génico, lo cual es frecuente en distintos cánceres humanos.^{16, 17, 18.} En este estudio se evaluó el estado de metilación del promotor de los genes MGMT y FHIT en cáncer cervical, lesiones precancerosas y tejido cervical normal.

La metilación del promotor de MGMT se ha asociado con el silenciamiento genético en gliomas y cáncer de colon.^{15, 16} Existen pocos estudios que hayan analizado la metilación del promotor de MGMT en el cérvix. En la presente investigación se encontró que en tejido cervical normal, el 17.5% (7 de 40) de las muestras presentó metilación del promotor de MGMT, a diferencia de lo encontrado por Seung³¹ y por Virmani³⁴ los cuales no encontraron metilación en tejido normal. Aunque es importante mencionar que Virmani en su estudio usó como tejido control DNA de linfocitos circulantes y DNA de epitelio bucal, a diferencia de este estudio en el que se usó como control 40 muestras de DNA de tejido cervical normal, mientras que Seung, a pesar de que usó tejido cervical normal, sólo incluyó 24 muestras, lo que tal vez explique sus resultados. La frecuencia de metilación en cáncer cervical para MGMT en este estudio fue del 36.6%, Virmani para el mismo gen reportó 26% y Seung encontró una frecuencia más baja (8%). En LEIBG se observó metilación de MGMT en el 37.5% y Virmani reporta metilación en el 29% de las lesiones de alto grado. La metilación encontrada en las muestras de LEIAG no las contrastamos debido a que sólo incluimos una muestra.

En el cáncer cervical y en las lesiones preinvasoras es común encontrar eliminaciones en la región 3p entre las posiciones 3p13 y 3p21.1.¹¹ En diversos tipos de cáncer es frecuente encontrar anomalías en el gene FHIT debido a que este se encuentra dentro del sitio frágil FRA3B en 3p14.¹¹ En el presente trabajo la frecuencia de metilación para FHIT en tejido cervical normal fue del 37.5% a diferencia de lo encontrado por Virmani³⁴ y Narayan²⁸ que no detectaron metilación en tejido normal. Lo encontrado por Narayan podría ser explicado debido a que solo incluye 8 muestras de tejido cervical normal como control, la naturaleza de los controles usados por Virmani, que ya fue explicada arriba, también podría explicar sus resultados sobre FHIT. La frecuencia de metilación en cáncer cervical para FHIT fue del 53.6%, Virmani y col. previamente reportaron 32% y Narayan y col., 11%. En las muestras de lesiones de grado bajo detectamos metilación en el 46.1% de las muestras mientras que Virmani y col., no detectaron metilación en lesiones de alto grado.

Nuestro análisis de riesgo de LEIBG y cáncer cervical debido a la metilación de MGMT y FHIT mostró que al analizar a los genes por separado existe asociación entre la presencia de metilación en los dos genes y LEIBG y cáncer cervical, pero esta no es estadísticamente significativa, aunque para MGMT existe una clara tendencia hacia la significancia. Cuando analizamos la metilación de MGMT y FHIT juntos encontramos asociaciones significativas para el riesgo de LEIBG y cáncer cervical (cuadro IV), lo que podría ser esperado, ya que al realizar el análisis de la forma anterior estamos sumando el evento de la posible eliminación o disminución en la expresión de las proteínas de los genes MGMT y FHIT (debido a la metilación de su promotor como vía para la eliminación o disminución en la expresión), claramente importantes para el funcionamiento normal de una célula y que además pueden contribuir al desarrollo de LEIBG y cáncer cervical.

Como se observa, existen diferencias entre los resultados aquí mostrados y entre los previamente reportados, en cuanto a la frecuencia de la metilación de MGMT y FHIT. En la presente investigación detectamos para ambos genes frecuencias de metilación más altas que en otros trabajos. Dichas diferencias no pueden ser explicadas en función de la metodología utilizada, ya que todos los estudios utilizaron PCR-SM como método de detección de promotores metilados, por lo que las diferencias son explicadas por otros fenómenos, como por ejemplo, la genética propia de la población estudiada. Como se ha reportado, la población mexicana a nivel mundial presenta una de las incidencias más altas de cáncer cervical.^{1,24} Por otro lado, los casos de cáncer cervical que se presentan en otras regiones del mundo tienen en común con los casos mexicanos a los genotipos de VPH detectados¹⁰ (generalmente genotipos 16, 18 y 33) y a algunos factores de riesgo clásicos ampliamente estudiados^{6, 20} (multiparidad, relaciones sexuales con múltiples parejas, inicio temprano de las relaciones sexuales,

uso de anticonceptivos orales entre otros), por lo que las diferencias entre la incidencia de cáncer cervical pudieran ser explicadas, entre muchas otros, por eventos epigenéticos, como pudieran ser los niveles de metilación en los genes MGMT y FHIT y quizá en varios genes más que aún no han sido estudiados e incluso en otros eventos epigenéticos como alteraciones en los niveles de acetilación y metilación de histonas.

En conclusión, el VPH tipo 16 fue el más frecuente en las muestras de citología normal, LEIAG y cáncer cervical y en las LEIBG el VPH tipo 33. La metilación de los promotores de los genes MGMT y FHIT es un evento frecuente en el cáncer cervical, siendo más frecuente la metilación en FHIT que en MGMT. Debido a la observación de presencia de metilación en MGMT y FHIT desde la citología normal hasta el cáncer cervical, podemos decir que la metilación en estos dos genes podría ser un evento temprano en el desarrollo de cáncer cervical. Las pacientes con metilación en ambos genes tienen más riesgo de desarrollar LEIBG y cáncer cervical que las que no presentan metilación. Por otro lado, la determinación de la metilación de los genes MGMT y FHIT y de otros genes más, podrían ser útiles para identificar subgrupos con mayor riesgo de progresión hacia cáncer cervical. Es claro también, que en este estudio prácticamente no se estudió a las LEIAG, por lo que necesitan realizarse estudios más amplios de la metilación de MGMT y FHIT en donde se incluyan todos los grados lesión del cáncer cervical que ayuden a establecer resultados más consistentes.

REFERENCIAS

1. **Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM.** Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 2003;45 supl 3:S306-S314.
2. **Balmain A.** New-age tumour suppressors. *Nature* 2002;417:235-237.
3. **Bauer HM, Greer EC, Manos MM.** Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. En: Herrington SC, McGee OJ, ed. *Diagnostic molecular pathology: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press;1992:131-152.
4. **Bauer HM, Manos MM.** PCR detection of genital human papillomavirus. En: Persing HD, Emith FT, Tenover CF, White JT, ed. *Diagnostic molecular microbiology*. Washington, DC: American society for microbiology;1993:407-413.
5. **Baylin BS, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG.** Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* 2001;10(7):687-692.
6. **Bayo S, Bosch FX, De Sanjosé S, Muñoz N, Combita AL, Coursaget P et al.** Risk factors of invasive cervical cancer in Mali. *Int J Epidemiol* 2002;31:202-209.
7. **Bernard HU, Chan YS, Manos MM, Ong KC, Villa LL, Delius H.** Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infec Dis* 1994;170:1077-1085.
8. **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development* 2002;16: 6-21.
9. **Bird AP, Wolffe AP.** Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-454.

-
-
10. **Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen MA, Peto J et al.** Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(11):796-802.
 11. **Butler D, Collins C, Mabruk M, Leader B, Kay W.** Loss of Fhit expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2002;86:144-149.
 12. **Butler D, Collins C, Mabruk M, Walsh BC, Leader BM, Kay WE.** Deletion of the FHIT gene in neoplastic and invasive cervical lesions is related to high-risk HPV infection but is independent of histopathological features. *J Pathology* 2000;192:502-510.
 13. **Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S.** Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003;88:63-73.
 14. **Das CB, Sharma KJ, Gopalakrishna V, Luthra KU.** Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992;73:2327-2336.
 15. **Esteller M, Corn GP, Baylin BS, Herman GJ.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61(8):3225-3229.
 16. **Esteller M, García J, Andion E, Goodman S, Hidalgo O, Vanaclocha V et al.** Inactivation of the DNA – repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343(19):1350-1354.
 17. **Esteller M, Stanley R, Hamilton S, Burger P, Baylin S, Herman J.** Inactivation of the DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-797.
 18. **Esteller M.** Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 2000;36(18):2294-2300.

-
-
19. **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
 20. **Franceschi S, Rajkumar T, Voccarela S, Gajalakshmi, Sharmila A, Snijders PJ et al.** Human papillomavirus and risk factors for cervical cancer in Chennai, India: a case-control study. *Int J Cancer* 2003;107:127-133.
 21. **Hansen KW, Kelley RM.** Review of mammalian DNA repair and translational implications. *JPET* 2000;295:1-9.
 22. **Herman GJ, Graff J, Myohanen S, Nelkin B, Baylin S.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:9821-9826.
 23. **Kohno T, Yokota J.** How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999;20(8):1403-1410.
 24. **Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Cruz A, Shah VA, Alonso P et al.** Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 2001;91:412-420.
 25. **Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé D, Herrero R, Castellsague X, Shah VK et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-527.
 26. **Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Tafur I, Izarzugaza I, Gili M et al.** Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:423-431.
 27. **Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, Zhao W, Higashimoto K, Satoh Y et al.** Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene expression in human cancer. *Oncogene* 2003;22:8835-8844.

-
-
28. **Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Vilella J et al.** Frequent promoter methylation of CDHI, DAPK, RARB and HICI genes in carcinoma of cervix uteri: Ist relationship to clinical outcome. *Molecular cancer* 2003;2:24.
 29. **Pylkkänen L, Wolff H, Stjernvall T, Tuominen P, Sioris T, Karjalainen A et al.** Reduced FHIT protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients. *Int J Oncol* 2001;20:285-290.
 30. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** *Molecular cloning: A laboratory manuel.* 2^a. edición. Nueva York(NY):Cold Spring Harbor,1989;vol.2:9-16.
 31. **Seung MD, Hy-Sook K, Seo-Hee R, Sidransky D.** Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Carcer Res* 2001;7:1982-1986.
 32. **Shahjehan A, Laird W, DeMeester T.** DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg* 2001;234:10-20.
 33. **Srivenugopal KS, Ali-Osman F.** The DNA repair protein, O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene* 2002;21:5940-5945.
 34. **Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar FA.** Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2001;7:584-589.
 35. **Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer A, Shah KV et al.** Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
 36. **Zöchbauer-Müller S, Fong MK, Maitra, Lam S, Geradts J, Ashfaq R et al.** 5' CpG island methylation of the *FHIT* gene Is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 2001;61:3581-3585.