



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

**“METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE
LOS GENES REPARADORES DE DNA hMLH1
Y hMSH2 EN CÁNCER CERVICOUTERINO”**

T E S I S

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

P R E S E N T A :
JULIO ORTIZ ORTIZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR

CHILPANCINGO, GRO., MARZO DE 2006.

**Metilación de los promotores de los genes reparadores de DNA
hMLH1 y hMSH2 en cáncer cervicouterino**

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

Bajo la dirección de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

y con la asesoría de:

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Alfonso Bernabé Carreño

Dr. Alejandro Millán Vega

El presente trabajo se desarrolló con el financiamiento del Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Guerrero, clave: GUE-2002-C01-6523

Durante el período febrero-julio de 2005 el **C. Julio Ortiz Ortiz** fue becario del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios por que siempre me ha fortalecido para cumplir cada una de las metas que me he propuesto. **Josué 1:9, Isaías 41:10, Filipenses 4:13.**

Agradezco de forma especial a mi directora de tesis, Dra. Berenice Illades Aguiar por la ayuda, el tiempo brindado y la confianza que depositó en mí para el desarrollo de este trabajo y además por sus consejos y regaños en el momento justo. **Proverbios 13:20, Proverbios 18:24**

Agradezco también a mis asesores, Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño, Dra. Mónica Espinoza Rojo, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dr. Alfonso Bernabé Carreño y al Dr. Alejandro Millán Vega por sus valiosas aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo. **Proverbios 13:20, Proverbios 18:24**

Al M. en C. Daniel Hernández Sotelo por su amistad, su valioso apoyo, sus aportaciones y su tiempo invertido en la realización de este trabajo. **Proverbios 18:24**

A la M. en C. Verónica Antonio Vejar, por su amistad, disponibilidad y apoyo en la realización de este trabajo. **Proverbios 18:24**

A la QBP. Norma Edith Martínez Hernández y la QBP. Natividad Sales Linares por su amistad, disponibilidad y apoyo en la realización de este trabajo. **Proverbios 18:24**

A la M. en C. Gloria Fernández Tilapa y la Biol. Paola Ramírez Macedo quienes siempre están en la mejor disposición de apoyarnos como estudiantes gracias por su amistad y apoyo. **Proverbios 18:24**

DEDICATORIAS

A mis padres⁺ a quienes llevo en mi corazón y se que siempre estarán conmigo. **Proverbios 1:8-9**

A mis hermanos Francisco, Adela, Donaciano⁺, Antonia, Mercedes, Maximino, Dulce María⁺ que han confiado en mí y siempre me han apoyado en todo, a mis sobrinos Miguel Ángel, Emmanuel, Dulce María, Yamilet, Juan Carlos, Israel, Aldair, Francisco, Josué Santiago y Ángel Saudit. **1ª Juan 2:10, 3:16**

A HILDA que ha llenado mi vida de amor y que me ha motivado para seguir adelante TE AMO. **Génesis 2:18**

A mis amigas. Toñita, Aurora, Marleni, Dino, Faby, Rubí, Maggy, Maty, Clara, Monse y Nadia. **Proverbios 18:24**

A mis amigos. Jorgito, Javier, Cecilio, Migue, Pedro, Toñito, Martín, Oscar, Migue y Luis. **Proverbios 18:24**

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	i
Índice de cuadros	ii
Índice de figuras	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	4
III. RESULTADOS	6
IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	10
V. REFERENCIAS	14

ABREVIATURAS

VPH	Virus del papiloma humano
LEIBG	Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado
LEIAG	Lesión escamosa intraepitelial de alto grado
MMR	Reparación mismatch
HNPCC	Cáncer colorectal no poliposo hereditario
CaCu	Cáncer cervicouterino
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
MSI	Inestabilidad microsatélite
PCR-SM	PCR sensible a metilación
RM	Razón de momios
DNMTs	DNA metiltransferasas
hMLH1	Gen reparador de DNA
hMSH2	Gen reparador de DNA

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro I. Frecuencia de metilación aberrante de los genes hMLH1 y hMSH2 durante la carcinogénesis cervical.	7
Cuadro II. Riesgo de LEIBG, LEIAG y cáncer cervical por presencia de metilación del promotor de hMLH1 y hMSH2.	8
Cuadro III. Frecuencia de VPH y metilación de los promotores de hMLH1 y MSH2 estratificada por el tipo de lesión.	8
Cuadro IV. Frecuencia de los genotipos de VPH y metilación de los promotores de hMLH1 y hMSH2 estratificada por el tipo de lesión.	9
Cuadro V. Frecuencia de metilación del gen hMLH1 en diversos estudios de acuerdo al grado de lesión.	11

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<i>Figura 1.</i> PCR-SM de hMLH1 en muestras de DNA cervical.	6
<i>Figura 2.</i> PCR-SM de hMSH2 en muestras de DNA cervical.	6

RESUMEN

Objetivo. Analizar el estado de metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2, en tejido cervical normal, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y CaCu. **Materiales y métodos.** Se realizó un estudio transversal analítico, en donde se utilizó DNA del banco de DNA del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero. La presencia del DNA de VPH y la genotipificación fueron determinadas previamente mediante PCR con los iniciadores MY11 MY09 y mediante RFLPs respectivamente. La detección de la metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2 se hizo mediante la reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación (PCR-SM), 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 101 muestras: 40 de citología normal, 21 de LEIBG, 20 de LEIAG y 20 de CaCu. La frecuencia de metilación en el promotor del gen hMLH1 fue más alta en cáncer cervical invasor (95%) que en LEIAG (55%), LEIBG (90.5%) y citología normal cervical (77.5%). La frecuencia de metilación del gen hMSH2 fue más baja en CaCu (5%) que en LEIBG (14.3%) y LEIAG (25%). Solo el 5% de los casos de CaCu y el 10% de LEIAG presentaron metilación en los dos genes. No se encontró asociación significativa entre el estado de metilación de los genes hMLH1 y hMSH2 y el desarrollo del cáncer. **Conclusiones.** La metilación del promotor del gen hMLH1 es más frecuente que la del gen hMSH2. La metilación del promotor de los genes hMLH1 y hMSH2 es un evento que está presente durante el desarrollo del CaCu. Los resultados de este estudio pueden servir de base para trabajos subsiguientes, con el propósito de que los patrones de metilación aberrantes en mujeres con citología normal y LEIBG sean útiles para identificar a subgrupos con mayor riesgo de progresión a CaCu.

ABSTRACT

Aim. Analyze the methylation status of the promoters of the hMLH1 and hMSH2 genes in normal cervical cytology, 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, where it was used DNA of DNA Bank from Molecular Biomedicine Laboratory of the Unidad Académica of Ciencias Químico Biológicas of the Universidad Autónoma of Guerrero. The presence of HPV DNA and genotyping were previously determined by PCR using the primers MY11 and MY09 and RFLPs respectively. The methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes was determined using the methylation sensitive PCR method, previous modification with sodium bisulfite. Associations between variables were established using the exact Fisher test or X^2 . **Results.** One hundred one samples were analyzed: 40 of normal cytology, 21 of LGSIL, 20 HGSIL and 20 of cervical cancer. The frequency of promoter methylation of hMLH1 gene was higher in invasive cervical cancer (95%) than in HGSIL (55%), LGSIL (90.5%) and normal cervical cytology (77.5%). The frequency of promoter methylation of hMSH2 gene was lower in cervical cancer (5%) than in LGSIL (14.3%) and HGSIL (25%). Only 5% from cases with cervical cancer and 10% of HGSIL showed methylation in two genes. It was not found a significant association between the methylation status of the hMLH1 and hMSH2 genes and the development of cervical cancer. **Conclusions.** The promoter methylation of hMLH1 gene is more frequent than the of hMSH2 gene. The promoters methylation of hMLH1 and hMSH2 genes it is an event that occur during the development of the cervical cancer. The results of this study may be used as base to further investigations, with the purpose of which aberrant patterns of methylation in the women with normal cytology and LGSIL may be used to identify subgroups with higher risk of progression into invasive cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvicouterino (CaCu) es el segundo cáncer más prevalente en el mundo, con incidencias solo por debajo del cáncer de mama, es la quinta causa principal de muerte por cáncer en mujeres y el más común en países en vías de desarrollo.^{22,26} Aproximadamente 470,000 nuevos casos de CaCu son diagnosticados anualmente, siendo la edad promedio del desarrollo de la malignidad 52 años.²⁶ Diversos estudios muestran al virus del papiloma humano (VPH) como un factor esencial pero no suficiente en la patogénesis del CaCu y otros cánceres anogenitales, de hecho ha sido implicado en el 99.7% de todos los casos de cáncer celular escamoso cervical.^{22,27,40} Un alto porcentaje de CaCu está asociado con la infección por VPH de alto riesgo oncogénico, el más prevalente es el VPH-16, seguido por los VPH-18, 31, 33 y 45.^{28,40} Se ha mostrado que estos tipos de VPH, específicamente los tipos 16 y 18 participan en la carcinogénesis cervical a través de la expresión de sus proteínas oncogénicas E6 y E7, las cuales desregulan la actividad mitótica de la célula huésped uniéndose e inactivando las proteínas p53 y pRB. Las proteínas oncogénicas virales interrumpen las vías reguladoras del crecimiento celular y modifican el ambiente de la célula huésped, facilitando la síntesis de DNA, proliferación celular anormal y la replicación viral.^{22,26,27,40} Por lo tanto, el CaCu al igual que otros tipos de cáncer es una enfermedad multifactorial, un alto porcentaje de infecciones por VPH pueden ser revertidas, por lo que otros factores son necesarios para su desarrollo.²⁷ Entre los múltiples factores involucrados en el origen y desarrollo del cáncer cérvicouterino se encuentran las anormalidades genéticas y epigenéticas.⁴

Tanto las anormalidades genéticas, que incluyen anormalidades cromosomales, mutaciones en genes supresores de tumor, genes reparadores de DNA y oncogenes, como los cambios epigenéticos, que incluyen metilación de DNA y acetilación de histonas, son factores importantes en el desarrollo del cáncer. La metilación de DNA es una modificación química covalente que ocurre en la citosina, en dinucleótidos CpG. Esta es la modificación epigenética más frecuente en genomas de vertebrados, además juega una parte esencial en el control de la expresión de genes para el desarrollo normal y en la inactivación del cromosoma X.^{10,37} En vertebrados, los genomas están globalmente metilados, con excepción de las islas CpG que son regiones de DNA ricas en CG, que se encuentran en los promotores de aproximadamente el 60% de los genes transcritos y que están asociadas con la actividad transcripcional. Se ha mostrado que el estado de metilación de estas islas CpG está involucrado en la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumor y reparadores del DNA.^{1,4,21} El genoma de las células cancerosas muestra simultáneamente hipometilación global e hipermetilación específica en ciertos promotores.⁴

La hipermetilación de promotores se ha aceptado como mediador de la tumorigénesis, ya que se ha encontrado en genes reparadores de DNA y en genes supresores de tumor cuya alteración influye en el desarrollo de ciertos cánceres. Adicionalmente, no se han encontrado mutaciones genéticas en estos genes silenciados epigenéticamente en diferentes tipos de células cancerosas.⁴ Varios estudios han revelado hipermetilación de los promotores de genes reparadores de DNA y de genes supresores de tumor tales como hMLH1, hMSH2, MGMT, CDMI, APC, p73 y GSTP1, que están asociadas con diversos tipos de cáncer.^{14,21, 30, 32,37,38,41}

Los sistemas de reparación mismatch (MMR), están conservados evolutivamente desde las bacterias hasta los humanos y juegan un papel importante evitando mutaciones, removiendo apareamientos incorrectos base-base y pequeñas inserciones-eliminaciones que aumentan durante la replicación del DNA, manteniendo así la fidelidad del genoma durante la proliferación celular. Las proteínas de MMR también están involucradas en la activación de los puntos de chequeo del ciclo celular y en la inducción de apoptosis cuando el daño al DNA rebasa el umbral crítico.^{7,11,12,15,25,33} El sistema MMR mejor estudiado es el de *Escherichia coli* que incluye tres proteínas: MutS, MutH y MutL. En levaduras y células humanas existen múltiples homólogos de estas proteínas que interactúan entre sí formando heterodímeros. El reconocimiento de apareamientos incorrectos en células humanas es realizado principalmente por un complejo heterodimérico, MutS α , compuesto de las proteínas MSH2 y MSH6; que reconoce y se une a apareamientos incorrectos de una sola base y bucles de 2 a 3 bases. Un heterodímero menos abundante, MutS β , está compuesto de las proteínas MSH2 y MSH3 y reconoce principalmente bucles de DNA que contienen 2 o más bases. Después de la etapa de reconocimiento, los dímeros MutS reclutan a otros complejos heterodiméricos: MutL α , que está compuesto de las proteínas MLH1 y PMS2, y MutL β que está compuesto por las proteínas MLH1 y PMS1 o MLH3. La formación del complejo MutS-MutL activa la escisión hasta de 1kb de la cadena de DNA recién sintetizada que contiene el apareamiento incorrecto. El hueco en la cadena es llenado por una DNA polimerasa y la DNA ligasa restaura la integridad de la cadena de DNA.^{7,11,12,15,16,25}

El gen hMLH1 se localiza en el cromosoma 3p21.3 y codifica para la proteína MLH1. Los estudios sobre la estructura y función de la proteína MLH1 han revelado la importancia de un dominio ATPasa y residuos adicionales de aminoácidos en la región N-terminal, por lo que se cree que esta región puede tener múltiples funciones en el proceso del sistema MMR.¹⁶ La proteína MLH1 forma un heterodímero con PMS2 que participa en la corrección del apareamiento incorrecto generado por errores de replicación, además, la respuesta celular al daño al DNA requiere la activación de MLH1, la cual puede cooperar con p53 para promover

el arresto del ciclo y la muerte celular; además se ha mostrado que PMS2 activado estabiliza a p73, un miembro de la familia de p53 requerido para la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño al DNA. Así, p53 activada induce el arresto del ciclo celular a través de la inducción de p21/WAF y la expresión de MLH1 y PMS2 como parte de la respuesta para iniciar la reparación. Cuando el daño excede el punto en el cual la reparación es posible, MLH1 y PMS2 como sensores de este daño desencadenan la apoptosis estabilizando p73.^{7,12}

El gen hMSH2 se localiza en el cromosoma 2p22-p21, codifica para la proteína MSH2, que forma dímeros con MSH6 y MSH3, los cuales muestran especificidad de sustrato para el tipo de apareamiento incorrecto que conduce a la represión de la recombinación homóloga llamada también rechazo heteroduplex. El dímero MSH2-MSH3 participa en la corrección de apareamiento incorrecto generado por los errores de replicación y facilita el alineamiento de cadena sencilla en eventos donde ocurre el rompimiento de la doble cadena en una región flanqueada por repeticiones directas. Además, se ha propuesto que el dímero MSH2-MSH3 actúa durante el alineamiento de cadena sencilla estabilizando la región alineada y/o reclutando las endonucleasas Rad1p-Rad10 para el entrecruzamiento homólogo-nohomólogo.^{8,15,16,20}

Los defectos en el sistema MMR debido a mutaciones e inactivación de los genes hMLH1 y hMSH2 son más frecuentes en cáncer colorectal no-poliposo hereditario (HNPCC), el cual muestra una alta frecuencia de mutaciones en secuencias microsatélites por errores de replicación conocidos como inestabilidad microsatélite (MSI), además, varios tipos de cáncer pueden exhibir también MSI. Por otra parte, varios estudios sugieren que el mecanismo más común causante de la MSI es el silenciamiento transcripcional de genes reparadores de DNA del sistema MMR, principalmente hMLH1 y hMSH2 por la hipermetilación de su promotor.^{17,25,31,33} Además, en el caso del promotor del gen hMLH1 se ha identificado una región del promotor altamente asociada al silenciamiento de su expresión por hipermetilación conocida como región C pequeña.^{9,17,39} En el estudio realizado por Su Hyung Hong y col.²¹ se encontró que este cambio es más frecuente en mujeres. Poco se conoce sobre la inactivación de estos genes en CaCu, existen pocos estudios publicados sobre el estado de metilación de los promotores de estos genes en esta malignidad y sus lesiones precursoras, por lo que es necesario realizar estudios a este respecto. En este trabajo se analizó el estado de metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2 por PCR-SM (reacción en cadena de la polimerasa sensible a metilación) en tejido cervical normal, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG), lesión escamosa intraepitelial de alto grado (LEIAG) y CaCu.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras. Se realizó un estudio transversal analítico, en donde se utilizó DNA obtenido de 101 muestras del banco de DNA del Laboratorio de Biomedicina Molecular, de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad Autónoma de Guerrero. De las cuales 21 eran de LEIBG, el 95% tenía infección por VPH, 20 de LEIAG, el 85% tenía infección por VPH, 20 de CaCu, el 100% tenía infección por VPH y 40 de tejido cervical normal, donde el 35% tenía infección por VPH, los genotipos de VPH detectados en los cuatro grupos diferentes de las muestras analizadas estaban de la siguiente manera: en las muestras de CaCu el VPH tipo 16 fue el que se encontró con más frecuencia. En LEIAG el VPH tipo 31 fue más frecuente seguido de los VPH tipos 16 y 81, el 10% de las muestras presentaban infección múltiple. En LEIBG el VPH más frecuente fue el tipo 33 seguido del VPH tipo 16 y el 9.5% de las muestras presentaban infección múltiple. En las muestras de tejido cervical normal los VPH tipos 16 y 58 fueron los más frecuentes y el 17.5% de las muestras presentaban VPH de alto riesgo. En LEIBG y CaCu todas las muestras que se genotipificaron fueron de alto riesgo oncogénico, mientras que en LEIAG el 20% de las muestras presentaban VPH de bajo riesgo oncogénico. La detección del DNA de VPH mediante PCR con los iniciadores MY11 y MY09² y la genotipificación mediante RFLPs⁵, fueron realizados previamente por nuestro grupo de trabajo.

Modificación con bisulfito de sodio. En esta reacción la citocinas no metiladas son convertidas a uracilo, pero aquellas que están metiladas permanecen como citocinas. La modificación se realizó como lo reportan Herman y col.¹⁹ Se desnaturalizaron 4 µg de DNA en un 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 se incubó bajo aceite mineral por 16 h a 50 °C. El DNA modificado se purificó con Wizard DNA Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI) y fue 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 y finalmente el DNA se resuspendió en 20 µl de H₂O desionizada estéril.¹⁹ Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

PCR-SM. El estado de metilación de los genes hMLH1 y hMSH2 se determinó mediante PCR-SM previa modificación con bisulfito de sodio, y en la cual se utilizaron iniciadores específicos para secuencias no metiladas y metiladas. Los iniciadores para la región C

pequeña del promotor del gen hMLH1 fueron: para secuencias no metiladas el sentido, 5'-taaaaatgaattaataggaagagtgatagtg-3', antisentido, 5'-aatctcttcacccctccctaaaaca-3' y para secuencias metiladas el sentido 5'-aacgaattaataggaagagcgatagcg-3', antisentido, 5'-cgtccctccctaaaacgactactaccc-3'.¹⁷ Para el promotor del gen hMSH2 los iniciadores fueron: para secuencias no metiladas el sentido 5'-ggttgttggttgatgtgttt-3', antisentido, 5'-caactacaacatctcctcaactacacca-3', y para secuencias metiladas el sentido, 5'-tcgtggtcggacgctcgttc-3', antisentido, 5'-caacgtctcctcgactacaccg-3'.¹⁸ La mezcla de PCR para la región C pequeña del promotor del gen hMLH1 se realizó en un volumen de 50µl que contenía buffer para PCR Gold 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 200 µM, 1 µM de cada iniciador, 1.25 U de ampli taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y ~1µg DNA modificado con bisulfito de sodio. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf, modelo Ep Gradient, de la siguiente manera: desnaturalización inicial del DNA a 95°C por 10 min, seguidos por 39 ciclos a 92°C por 30 seg (temperatura de desnaturalización), 57°C por 30 seg (temperatura de alineamiento para secuencias no metiladas) y 62°C por 30 seg (temperatura de alineamiento para secuencias metiladas), 70°C por 30 seg (temperatura de extensión) y una extensión final a 70°C por 7 min.¹⁷ La mezcla de PCR para el promotor del gen hMSH2 se realizó en un volumen de 50µl que contenía buffer para PCR Gold 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 200 µM, 0.5 µM de cada iniciador, 1.25 U de ampli taq Gold DNA polimerasa (Applied Biosystems) y ~1µg DNA modificado con bisulfito de sodio. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf, modelo Ep Gradient, de la siguiente manera: desnaturalización inicial del DNA a 95°C por 10 min, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 45 seg (temperatura de desnaturalización), 66°C por 30 seg (temperatura de alineamiento para secuencias no metiladas) y 62°C por 30 seg (temperatura de alineamiento para secuencias metiladas), 72°C por 30 seg (temperatura de extensión) y una extensión final a 72°C por 10 min.³⁵ Como control positivo de la PCR para las secuencias no metiladas se usó DNA de leucocitos humanos de sangre periférica y como control positivo de la PCR para secuencias metiladas, DNA de leucocitos humanos tratado con Sssl metiltransferasa (New England BioLabs, Inc.). Como controles negativos de la PCR 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.^{17,35,37}

Análisis de datos. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 12.0. 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

Con la finalidad de analizar el estado de metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2, el DNA obtenido de 40 muestras de tejido cervical normal, 21 de LEIBG, 20 de LEIAG y 20 de CaCu, fue sometido a modificación con bisulfito de sodio, sometido a PCR-SM y posteriormente a electroforesis en geles de agarosa al 3%. El análisis de los geles de agarosa, los productos de PCR demuestran que si hay metilación en los promotores de ambos genes en los cuatro diferentes grupos de estudio, excepto en tejido cervical normal donde solo hay metilación en el promotor del gen hMLH1. La figura 1, muestra ejemplos representativos de los productos de PCR-SM de 102 pb para secuencias no metiladas y de 91 pb para secuencias metiladas de la región C pequeña del promotor del gen hMLH1 en los cuatro diferentes grupos de estudio. La figura 2, muestra ejemplos representativos de los productos de PCR-SM de 143 pb para secuencias no metiladas y de 132 pb para secuencias metiladas del promotor del gen hMSH2 en los cuatro diferentes grupos de estudio.

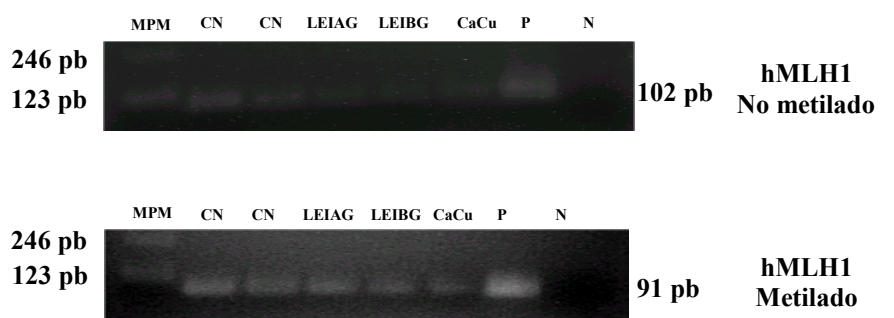


Figura 1. Productos de PCR-SM de hMLH1 en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; CN, células cervicales normales; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; LEIBG, lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; CaCu, cáncer cervicouterino; P, control positivo y N, control negativo.

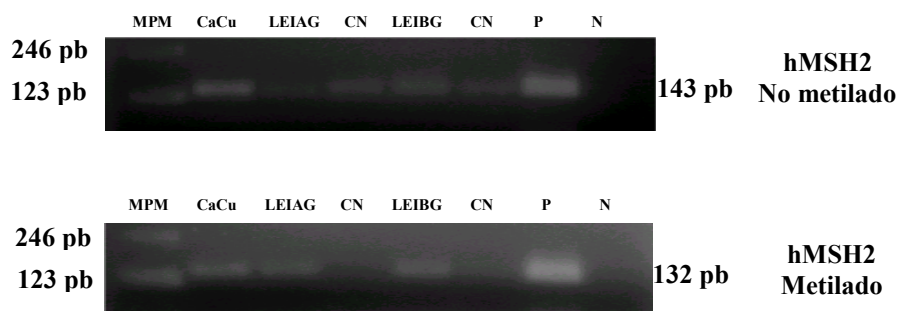


Figura 2. Productos de PCR-SM de hMSH2 en muestras de DNA cervical. MPM, marcador de peso molecular; CaCu, cáncer cervicouterino; LEIAG, lesión escamosa intraepitelial de alto grado; CN, células cervicales normales, LEIBG; lesión escamosa intraepitelial de bajo grado; P, control positivo y N, control negativo.

Para determinar la frecuencia de la metilación de los genes hMLH1 y hMSH2 los datos obtenidos fueron agrupados y colocados dentro de la categoría correspondiente. En el cuadro I se presentan los resultados de la frecuencia de la metilación de hMLH1 y hMSH2 de forma independiente, juntos y uno u otro. Es notorio observar que en las muestras de tejido cervical normal se detectó metilación sólo en el gen hMLH1 (77.5%). La frecuencia de metilación en hMLH1 resultó ser mayor en CaCu que en LEIBG, LEIAG y tejido cervical normal, mientras que la frecuencia de metilación en hMSH2 fue más alta en LEIAG (25%) que en CaCu (5%) y LEIBG (14.3%). El 77.5% de las muestras de tejido cervical normal, el 90.5% de las LEIBG, el 70% de las LEIAG y el 95% de CaCu presentaron metilación en cualquiera de los genes estudiados. Las muestras de tejido cervical normal no presentaron metilación en los dos genes a la vez a diferencia de LEIBG, LEIAG y CaCu.

Cuadro I

Frecuencia de metilación aberrante de los genes hMLH1 y hMSH2 en las muestras analizadas				
	hMLH1 No. (%)	hMSH2 No. (%)	hMLH1 o hMSH2 No. (%)	hMLH1 y hMSH2 No. (%)
Tejido cervical normal (n = 40)	31 (77.5)	0 (0.0)	31 (77.5)	0 (0.0)
LEIBG (n = 21)	19 (90.5)	3 (14.3)	19 (90.5)	3 (14.3)
LEIAG (n = 20)	11 (55)	5 (25)	14 (70)	2 (10)
CaCu (n = 20)	19 (95)	1 (5)	19 (95)	1 (5)

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el estado de metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2 y el desarrollo de LEIBG, LEIAG y CaCu (cuadro II).

Cuadro II

Riesgo de LEIBG, LEIAG y CaCu asociado a la metilación del promotor de hMLH1 y hMSH2				
	hMLH1 RM (IC 95%)	hMSH2 RM (IC 95%)	hMLH1 o hMSH2 RM (IC 95%)	hMLH1 y hMSH2 RM (IC 95%)
LEIBG	2.7 (0.48 – 28.49)		2.7 (0.48 – 28.49)	
LEIAG	0.35 (0.09 – 1.31)	2.0 (0.32 – 14.79)	0.67 (0.17 – 2.80)	0.66 (0.05 – 6.62)
Cáncer cervical	5.5 (0.65 – 254.2)	0.31 (0.005 – 4.47)	5.5 (0.65 – 254.2)	0.31 (0.005 – 4.47)

El grupo de citología cervical normal se usó como categoría de referencia para hMLH1
El grupo de LEIBG se usó como categoría de referencia para hMSH2 y para ambos genes metilados

En el cuadro III se relacionan la frecuencia de VPH y la metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2. Todas las muestras de citología cervical normal, LEIBG, LEIAG y CaCu con infección por VPH, presentaron más alta frecuencia de metilación para hMLH1 que las negativas a la infección viral.

Cuadro III

Frecuencia de VPH y metilación de los promotores de hMLH1 y hMSH2 estratificada por el tipo de lesión				
	hMLH1 (%)		hMSH2 (%)	
	M	NM	M	NM
Citología normal				
VPH Positivos (n=14)	85.7	14.3	0	100
VPH Negativos (n=26)	73.1	26.9	0	100
LEIBG				
VPH Positivos (n=20)	95	5	15	85
VPH Negativos (n=1)	0	100	0	100
LEIAG				
VPH Positivos (n=17)	52.9	47.1	17.6	82.4
VPH Negativos (n=3)	66.7	33.3	66.7	33.3
CaCu				
VPH Positivos (n=20)	95	5	5	95

M, promotor metilado; NM, promotor no metilado.

En el cuadro IV se compara la frecuencia de los genotipos de VPH y la metilación de los promotores de los genes hMLH1 y hMSH2.

Cuadro IV

Frecuencia de los genotipos de VPH y metilación de los promotores de hMLH1 y MSH2 estratificada por el tipo de lesión

	hMLH1 (%)		hMSH2 (%)	
	M	NM	M	NM
Citología normal				
VPH 16 (n=3)	66.7	33.3	0	100
VPH 53 (n=1)	100	0	0	100
VPH 58 (n=3)	66.7	33.3	0	100
VPH 61 (n=1)	100	0	0	100
VPH 70 (n=1)	100	0	0	100
VPH 81 (n=1)	100	0	0	100
VPH IM (n=1)	100	0	0	100
VPH NC (n=3)	100	0	0	100
Negativos (n=26)	73.1	26.9	0	100
VPH alto riesgo ^a (n=7)	71.4	28.6	0	100
VPH bajo riesgo ^b (n=3)	100	0	0	100
LEIBG				
VPH 16 (n=3)	100	0	0	100
VPH 18 (n=1)	100	0	0	100
VPH 33 (n=5)	100	0	40	60
VPH 52 (n=1)	100	0	0	100
VPH 58 (n=2)	50	50	0	100
VPH IM (n=2)	100	0	0	100
VPH NC (n=6)	100	0	16.7	83.3
Negativos (n=1)	0	100	0	100
VPH alto riesgo ^a (n=12)	91.7	8.3	16.7	83.3
LEIAG				
VPH 16 (n=3)	66.7	33.3	33.3	66.7
VPH 18 (n=1)	0	100	0	100
VPH 31 (n=4)	25	75	0	100
VPH 33 (n=2)	0	100	0	100
VPH 58 (n=1)	100	0	0	100
VPH 70 (n=1)	100	0	100	0
VPH 81 (n=3)	100	0	0	100
VPH IM (n=2)	50	50	50	50
Negativos (n=3)	66.7	33.3	66.7	33.3
VPH alto riesgo ^a (n=11)	36.4	63.6	9.1	90.9
VPH bajo riesgo ^b (n=4)	100	0	25	75
CaCu				
VPH 16 (n=15)	93.3	6.7	6.7	93.3
VPH 18 (n=1)	100	0	0	100
VPH 33 (n=1)	100	0	0	100
VPH NC (n=3)	100	0	0	100
VPH alto riesgo ^a (n=17)	94.1	5.9	5.9	94.1

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

^aVPH alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 52, 53 Y 58. ²⁹

^bVPH bajo riesgo: 61, 70 y 81. ²⁹

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La metilación es una modificación epigenética esencial para el desarrollo normal de los mamíferos.³⁵ Sin embargo, la metilación aberrante de los promotores de genes reparadores de DNA y genes supresores de tumor se ha asociado con la pérdida de la expresión de las proteínas o silenciamiento génico. El primer gen supresor conocido hipermetilado y silenciado fue *Rb*, el cual fue seguido por múltiples publicaciones describiendo resultados similares para una variedad de genes supresores de tumor, entre ellos p16, hMLH1, VHL y E-caderina.¹⁰ La metilación del DNA en las regiones promotoras en varios genes es un evento epigenético reconocido como un cambio importante y frecuente en el desarrollo de muchos cánceres humanos.^{3,32,37,41} En el presente estudio se evaluó el estado de metilación del promotor de los genes hMLH1 y hMSH2 en muestras de DNA procedentes de CaCu, lesiones precancerosas y tejido cervical normal.

La metilación del promotor del gen hMLH1 se ha asociado con el silenciamiento genético en otros tipos de cáncer, como cáncer colorectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumorigénesis endometrial humano, cáncer colorectal no poliposo hereditario y cáncer gástrico.^{13,14,17,18,21,24,34,36,38,42} Existen pocos estudios que han analizado la metilación del promotor de hMLH1 en CaCu. En el presente trabajo se encontró que el 77.5% de las muestras de tejido cervical normal, presentó metilación del promotor del gen hMLH1, a diferencia de lo reportado por Widschwendter y col.,⁴¹ en una población austriaca; por Narayan y col.,³² en una población colombiana; y por Virmani y col.,³⁷ en una población estadounidense. En estos tres estudios, los autores no reportan metilación en tejido cervical normal. Es importante mencionar que a diferencia de este estudio en el que se usó como controles muestras de DNA proveniente de 40 muestras de tejido cervical normal, en el estudio de Virmani y col., los controles utilizados son muestras de DNA de linfocitos circulantes y de epitelio bucal. En el caso de los estudios de Widschwendter y col. y de Narayan y col. a pesar de que usan tejido cervical normal, sólo incluyen 13 y 8 muestras respectivamente, lo que podría explicar sus resultados. La frecuencia de metilación en CaCu para hMLH1 en este estudio fue del 95%, en LEIAG fue de 55% y en LEIBG fue de 90.5%, nuestros resultados difieren con los obtenidos en otros estudios (cuadro V).

Cuadro V

Frecuencia de metilación del gen hMLH1 en diversos estudios de acuerdo al grado de lesión.					
	Resultados de este estudio	Esteller y col.	Widschwendter y col.	Virmani y col.	Narayan y col.
Citología normal (n = 40)	77.5%	-	0%	0%	0%
LEIBG (n = 21)	90.5%	-	0%	3%	-
LEIAG (n = 20)	55%	-	3%	6%	-
CaCu (n = 20)	95%	43%	36%	5%	0%

En diversos tipos de cáncer es frecuente encontrar mutaciones o eliminaciones en el gen hMSH2 asociadas a la inestabilidad microsatélite.^{6,13,23,38,41,42} Sin embargo, son pocos los trabajos publicados sobre el estado de metilación en el promotor del gen hMSH2. En el trabajo realizado por Herman y col.¹⁸ en carcinoma colorectal, los autores no encuentran metilación en el promotor de dicho gen. Por otra parte, en el trabajo realizado por Yi-Ching Wang y col.³⁸ con 14 muestras de cáncer de pulmón ellos reportan una frecuencia de 28.6%. En el presente trabajo, la frecuencia de metilación para hMSH2 en CaCu fue de 5%, de 14.3% en LEIBG y de 25% en LEIAG mientras que en tejido cervical normal estuvo ausente. No existen trabajos publicados sobre el estado de metilación del promotor del gen hMSH2 en CaCu y lesiones precursoras con los cuales comparar nuestros resultados, por lo que se comparó la frecuencia de metilación con el trabajo realizado por Yi-Ching Wang y col.³⁸ en cáncer de pulmón, encontrándose, que la frecuencia de metilación es más baja en CaCu que en cáncer de pulmón.

En este estudio se encontró que la frecuencia de metilación del promotor del gen hMLH1 en los diversos tipos de lesión es más alta en presencia de la infección por VPH. Es importante mencionar que no se han reportado trabajos que asocien la metilación de los genes hMLH1 y hMSH2 con la infección por VPH en lesiones cervicales.

El análisis de riesgo de LEIBG, LEIAG y CaCu debido a la metilación de hMLH1 y hMSH2 mostró que, al analizar los genes por separado, existe asociación entre la presencia de metilación en hMLH1 y LEIBG y CaCu, y la presencia de metilación en hMSH2 y LEIAG; sin embargo, dicha asociación no es estadísticamente significativa. Por otra parte, aún cuando se analizó la metilación de hMLH1 y hMSH2 juntos no se encontró asociación significativa con el riesgo de LEIBG, LEIAG y CaCu.

Existen diferencias entre los resultados aquí mostrados y los previamente reportados, en cuanto a la frecuencia de la metilación de hMLH1 y hMSH2. En el presente trabajo detectamos para hMLH1 frecuencias de metilación más altas tanto en tejido cervical normal como para LEIBG, LEIAG y CaCu en comparación con otros trabajos (cuadro V). 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, excepto Widschwendter y col.,⁴¹ quienes utilizaron un ensayo de PCR en tiempo real basado en fluorescencia (MethylLight). Es importante mencionar que en este trabajo se utilizaron los iniciadores específicos para la región C pequeña del promotor de hMLH1, en la que se ha visto que la hipermetilación es más frecuente que en otras regiones del mismo promotor, además de que está altamente asociada con el silenciamiento génico de este gen en cáncer colorectal,^{9,17,41} en los estudios realizados por Narayan y col.³² y por Virmani y col.³⁷ se utilizaron iniciadores para regiones que presentan una frecuencia más baja de metilación. Esto podría explicar en parte la frecuencia de metilación más alta encontrada en este estudio en los diferentes grados de lesión. Por otra parte, los casos de CaCu que se presentan en otras regiones del mundo tienen en común con los casos mexicanos los genotipos de VPH detectados (generalmente genotipos 16, 18, 31, 33 y 45)^{26,28,40} y algunos factores de riesgo clásicos ampliamente estudiados (multiparidad, relaciones sexuales con múltiples parejas, inicio temprano de las relaciones sexuales, uso de anticonceptivos orales, entre otros).^{22,27} Así las diferencias en la incidencia de CaCu entre los distintos países pudieran ser explicadas, entre otras causas, por eventos epigenéticos, como pueden ser los niveles de metilación en los genes hMLH1, hMSH2 y otros genes más, que aún no han sido estudiados e incluso por otros eventos epigenéticos como alteraciones en los niveles de acetilación y metilación de histonas. Por otra parte, la alta frecuencia de metilación, tanto en tejido cervical normal como en los diferentes grados de evolución del cáncer, pudiera ser un evento explicado en parte por las diferencias genéticas entre poblaciones, es decir, por ejemplo el nivel de expresión de las DNA metiltransferasas (DNMTs) o por la presencia de polimorfismos que se asocien con una mayor capacidad de metilación en el DNA.

En conclusión la metilación de la región C pequeña del promotor del gen hMLH1 es un evento frecuente tanto en LEIBG, LEIAG y CaCu como en tejido cervical normal. Debido a la observación de presencia de metilación en la región C pequeña del promotor del gen hMLH1 desde el tejido cervical normal hasta el CaCu, podemos decir que la metilación en este gen, particularmente en esta región, podría ser un evento temprano y que permanece durante el desarrollo de CaCu. La metilación del promotor del gen hMSH2 es un evento poco frecuente en CaCu y un evento nulo en citología normal en este estudio. Por otro lado, la determinación de la metilación del gen hMLH1, hMSH2 y otros genes más, podría ser útil para identificar

subgrupos con mayor riesgo de progresión hacia CaCu. Además sería importante medir la presencia de la proteína MLH1, para verificar si la metilación de la región C pequeña del promotor del gen hMLH1 está asociada con su silenciamiento génico, así como el nivel de expresión y la presencia de polimorfismos en las DNMTs para verificar si la alta frecuencia de metilación en este gen se debe a la actividad alterada de estas proteínas.

REFERENCIAS

1. **Ballestar E, Wolffe PA.** Methyl – CpG – binding proteins. Targeting specific gene repression. *European Journal Biochemistry* 2001; 268: 1-6.
2. **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.
3. **Baylin BS, Esteller M, Rountree RM, Bachman EK, Schuebel K, Herman GJ.** Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(7):687-692.
4. **Baylin BS, Ohm EJ.** Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature* 2006; 6: 107-116.
5. **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. *Journal Infectious Diseases* 1994; 170: 1077-1085.
6. **Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Muisine PM et al.** MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Research* 2002; 62: 848 – 853.
7. **Chen J, Sadowki I.** Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc. National Academy Science* 2005; 102 (13): 4813 – 4818.
8. **Chen W, Robertson SJ.** The role of Mismatch Repair Machinery in regulating mitotic and meiotic recombination between diverged sequences in Yeast. *Genetics* 1999; 151:1299 – 1313.

-
9. **Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, and Kim SY.** Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Research* 1999; 59: 2029-2033.
 10. **Dueñas GA, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C and Cervera E.** Epigenetics of cervical cancer. An overview and the therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005; 4 (38): 1-24.
 11. **Earley CM and Crouse FG.** The role of mismatch repair in the prevention of base pair mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. National Academy Science USA* 1998; 95: 15487-15491.
 12. **Ellison AR, Lofing J and Bitter AG.** Human MutL homolog (MLH1) function in DNA mismatch repair: a prospective screen for missense mutations in the ATPase domain. *Nucleic Acids Research* 2004; 8 (18): 5321-5338.
 13. **Esteller M, Catusus L, Matias GX, Mutter JL, Prat J, Baylin SB and Herman JG.** hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *American Journal of Pathology* 1999; 155 (5): 1767-1772.
 14. **Esteller M, Corn GP, Baylin BS, Herman GJ.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 2001; 61(8):3225-3229.
 15. **Evans E and Alani E.** Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20 (21): 7839-7844.
 16. **Goldfarb T and Alani E.** Distinct roles for the *Saccharomyces cerevisiae* mismatch repair proteins in heteroduplex rejection, mismatch repair and nonhomologous tail removal. *Genetics* 2005; 169: 563-574.
 17. **Grady MW, Rajput A, Lutterbaugh DJ, and Markowitz DS.** Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer. *Cancer Research* 2001; 61: 900-902.

-
18. **Herman GJ, Umar A, Polyak K, Graff RJ, Ahuja N, et al.** Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. Proc National Academy Science 1998; 95: 6870–6875.
 19. **Herman GJ, Graff J, Myohanen S, Nelkin B, Baylin S.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc National Academy Science 1996; 93: 9821-9826.
 20. **Hoffmann RE, Eriksson E, Herbert JB and Borts HR.** MLH1 and MSH2 promote the symmetry of double-strand break repair events at the HIS4 hotspot in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 2005; 169: 1291-1303.
 21. **Hyung HS, Gak KH, Bok CW, Young KE, Young LJ, et al.** DNA hipermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. Journal Korean Medical Science. 2005; 20: 236-241.
 22. **Jung WW, Chun T, Sul D, Woo HK, Kang SH, Joo LD and Han I.** Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. The Journal of Microbiology 2004; 42 (4): 255-266.
 23. **Kamory E, Kolacsek O, Otto S and Csuka O.** hMLH1 and MSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. Pathology oncology research 2003; 9 (4): 236-241.
 24. **Kuismanen AS, Holmberg TM, Saloovaara R, De la Chapelle A and Peltomäki P.** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite unstable colorectal cancers. American Journal of Pathology 2000; 156 (5): 1773-1779.
 25. **Lei X, Zhu Y, Tomkinson A and Sun L.** Measurement of DNA mismatch repair activity in live cells. Nucleic Acids Research 2004; 32 (12): 1-10.
 26. **Longworth SM and Laimins AL.** Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2004; 68 (2): 362-372.

-
27. **Motoyama S, Ladines-Llave CA, Villanueva SL and Maruo T.** The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe Journal Medicine Science* 2004; 50 (1): 9-19.
 28. **Münger K, Baldwin A, Eduards MK, Hayakawa H, Nguyen LC et al.** Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology* 2004; 78 (21): 11451-11460.
 29. **Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé D, Herrero R, Castellsague X, Shah VK et al.** Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal Medicine* 2003; 348(6):518-527.
 30. **Myung DS, Kim HS, Rha SH and Sidranski D.** Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 1982-1986.
 31. **Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS and Kim H.** Effects of dietary intake and factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 2005; 11 (25): 3834-
 32. **Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Villella J et al.** Frequent promoter methylation of CDHI, DAPK, RARB and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: Ist relationship to clinical outcome. *Molecular cancer* 2003; 2:24.
 33. **Peterson RE, Reynolds M, Quievryn G and Zhitkovich A.** Mismatch repair proteins are activators of toxic responses to chromium-DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* 2005; 25 (9): 3596-3607.
 34. **Ricciardiello L, Goel A, Mantovani V, Fiorini T, Fossi E et al.** Frequent loss of hMLH1 by promoter hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. *Cancer Research* 2003; 63: 787-792.
 35. **Salvesen BH, MacDonald N, Ryan A, Iversen EO, Jacobs JI., Akslen AL and Das S.** Methylation of hMLH1 in a population-based series of Endometrial Carcinomas. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 3607-3613.

-
36. **Steven FA, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H et al.** Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Research* 1999; 59: 1090-1095.
 37. **Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar FA.** Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 584-589.
 38. **Wang YC, Lu YP, Tseng RC, Lin RK, Chang JW et al.** Inactivation of *hMLH1* and *hMSH2* by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *The Journal of Clinical Investigation* 2003; 111(6):887-895.
 39. **Warnick TC, Dabbas B, Ilstrup JS, Ford DC and Strait AK.** Cell type-dependent regulation of hMLH1 promoter activity is influenced by the presence of multiple redundant elements. *Molecular Cancer Research* 2003; 1: 610-618.
 40. **Wentzensen N, Vinokurova S and Knebel DM.** Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Research* 2004; 64: 3878-3884.
 41. **Widschwendter A, Gatringer C, Ivarsson L, Fiegl H, Schneitter A et al.** Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3396-3400.
 42. **Yi LS, Tsan YS, Ping CL, Man CK, Chan SYA and Ho CIJ.** hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Research* 1999; 59: 159-164.