

Metilação aberrante de DNA, câncer cervical e HPV

Aberrant DNA methylation, cervical cancer and HPV

Aline Almeida Barbaresco¹
Ruffo Freitas-Junior²
Márcia Antoniazzi Michelin³
Eddie Fernando Candido Murta⁴

Palavras-chave

Metilação de DNA
Genes
Neoplasias do colo do útero
HPV

Keywords

DNA methylation
Genes
Uterine cervical neoplasms
HPV

Resumo

O diagnóstico laboratorial de metilação de DNA pode ser uma ferramenta fundamental para auxiliar no rastreamento do câncer cervical. Os genes de metilação contribuem para o prognóstico de tumores do câncer cervical. O objetivo deste estudo foi identificar a frequência dos genes metilados mais frequentes no câncer cervical e a correlação da hipermetilação com a infecção por papilomavírus humano (HPV). Realizou-se uma revisão bibliográfica de publicações entre 2002 a 2012, utilizando-se a base de dados da PubMed. Os artigos selecionados revelaram que os genes metilados mais frequentes no câncer cervical são: CDH1, DAPK, RAR β , HIC1, DKK3, SFRP2, SOX17, WIF1, MGMT, hTERT e RASSF1A. Não houve correlação estatística significativa entre a positividade do HPV e a hipermetilação. Esses dados sugerem que os genes metilados mais frequentes no câncer cervical podem influenciar no início da progressão da doença. Acredita-se que o conhecimento sobre metilação de DNA no câncer cervical possa ser útil para prever as neoplasias do colo do útero, evitar a progressão da doença e servir como alvos de tratamento.

Abstract

Laboratory diagnosis of DNA methylation may be a fundamental tool to help cervical cancer screening. Methylated genes contribute to the prognosis of cervical tumors. The objective of this study was to identify the frequency of the methylated genes most commonly found in cervical cancer and the correlation between hypermethylation and human papillomavirus (HPV) infection. A literature review was conducted of papers published between 2002 and 2012 using the PubMed database. The selected papers showed that the most common methylated genes in cervical cancer are: CDH1, DAPK, RAR β , HIC1, DKK3, SFRP2, SOX17, WIF1, MGMT, hTERT and RASSF1A. No statistically significant correlation was found between HPV positivity and hypermethylation. These data suggest that the methylated genes most commonly found in cervical cancer may exert an effect on the onset of disease. It is believed that the knowledge about DNA methylation in cervical cancer may be useful for predicting uterine neoplasias, avoid disease progression and may reveal possible targets for treatment.

Estudo realizado no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiânia – Goiânia (GO); Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de Uberaba – Uberaba (MG), Brasil.

¹Doutoranda em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

²Professor Adjunto II e Coordenador do Programa de Mastologia da UFG; Ginecologista e mastologista do Serviço de Ginecologia e Mama de Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer de Goiás (ACCG) – Goiânia (GO), Brasil.

³Professora Associada da Disciplina de Imunologia, Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) – Uberaba (MG), Brasil.

⁴Professor Titular da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, IPON da UFTM – Uberaba (MG), Brasil.

Endereço para correspondência: Ruffo Freitas-Junior – Alameda das Rosas, 533, Setor Oeste – CEP: 74110-060 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail ruffojr@terra.com.br

Conflito de interesse: não há.

Introdução

A metilação baseia-se em uma modificação covalente do DNA em que um grupamento metil (CH₃) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC), geralmente precedido por uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferase (DNMT)¹ (A).

No genoma dos mamíferos, a metilação do DNA ocorre com maior frequência nos dinucleotídeos CpG de células diferenciadas, e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma² (B).

A metilação do DNA controla várias funções do genoma humano, como a recombinação durante a meiose, a replicação, o controle de DNA viral que se insere no genoma humano, a estabilização e a manutenção da expressão gênica, a regulação da diferenciação celular e a inativação do cromossomo X. Quando ocorre aberração na metilação da região promotora de um gene, isso pode levar à perda de função desse gene e ser muito mais frequente do que a mutação genética³ (B).

As alterações epigenéticas em tumores ocorrem com mais frequência na hipermetilação do que na hipometilação. A metilação de DNA em regiões ricas de citosina e guanina podem ocorrer em genes implicados com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, como supressão do tumor (p14, p15, p16, p73 e BRCA1), reparo do DNA (hMLH1 e MGMT), invasão e metástase (CDH1, ECAD, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e DAPK)⁴ (B). Esses genes podem ser identificados como marcadores da metilação de DNA. O câncer cervical (CC) configura-se como o segundo tipo de câncer mais frequente, e a quarta causa de morte por câncer em mulheres no Brasil. A principal alteração que pode levar ao câncer é a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV), de alguns tipos de alto risco⁵ (C), justificando a realização da revisão da literatura sobre a frequência dos genes metilados no câncer cervical e a correlação da hipermetilação com o HPV.

Métodos

Trata-se de uma revisão bibliográfica de publicações entre 2002 a 2012, utilizando-se a base de dados da *Public Medical Literature Analysis and Retrieval System on Line* (PubMed), com as seguintes palavras-chave: *methylation of DNA, cervical cancer and HPV*. Foram encontrados 98 artigos em língua inglesa, entre artigos originais e revisões, dos quais foram selecionados 10. Foram incluídos nessa revisão, principalmente, estudos que avaliaram a frequência de genes metilados de DNA no

câncer cervical como também a presença de DNA do HPV nas amostras cervicais. E foram excluídos artigos de revisão sobre metilação que ocorre fora da região promotora do gene metilado, metilação de histona e estudos sem relatos de análise molecular do HPV (Figura 1).

Resultados

Os principais resultados dos 10 estudos sobre metilação de DNA no câncer cervical e a presença de DNA do HPV foram elaborados de forma descritiva e expostos na Tabela 1⁶⁻¹⁵ (B).

Nos estudos selecionados para esta revisão, foram mencionados 53 genes metilados, dos quais 38 genes (SLIT2_1, SOX1, JPH3, LMX1A, POMC, WT1_1, SLIT1, CDH4, TFPI2, ALX3, DKK2_1, WT1_2, RPRM, SLIT2_2, LOC285016, p15^{INK4b}, ESR1, DCC, p16, LINE1, RARβ, HIC1, FHIT, CDKN2A, BRCA1, TP73, SOCS2, hMLH1, AXIN2, DKK3, SFRP2, SFRP4, SFRP5, SOX17, WIF1, WNT5A, TWIST1, DAPK1), foram estudados 1 vez, 13 (JAM3, EPB41L3, C13ORF18, TERT, p14^{ARF}, CDH1, DAPK, APC, MGMT, TIMP3, GSTP1, MLH1 e CDH13) foram pesquisados 2 vezes e dois (p16^{INK4a} e RASSF1A) analisados 3 vezes.

Houve metilação dos genes RASSF1A, CDH1, DAPK, RARβ, HIC1, BRCA1, SOCS1, TIMP3, GSTP1, DAPK, hTERT, CDH13, HSPA2, MLH1, SOCS2, JAM3, TERT, EPB41L3, C13ORF18, MGMT e hMLH1, TWIST1, DAPK1, p16^{INK4a}, p14^{ARF}, p15^{INK4b}, ESR1, DCC.

Discussão

A metilação do DNA tem sido constantemente estabelecida como desreguladora no desenvolvimento do câncer cervical¹⁶ (A). Quanto ao aumento da metilação de DNA, esse ocorre na região promotora dos genes durante a progressão da lesão¹⁷ (B). Alguns desses genes metilados mencionados na Tabela 1 foram relatados em CC, e esses genes podem potencialmente servir como biomarcadores de detecção precoce da doença.

Metilação de DNA dos genes estudados no câncer cervical

A metilação aberrante pode atuar no desenvolvimento da carcinogênese cervical¹⁷ (B). Tem sido proposto que, além da metilação aberrante, infecção por HPV, alterações genéticas ou epigenéticas podem manter um fenótipo maligno. Mudanças no estado de metilação do DNA estão entre as alterações moleculares mais comuns em neoplasias humanas¹⁸ (A). A Figura 2 apresenta metilação aberrante na região promotora do gene.

Todos os genes metilados e não metilados são detectados pela reação em cadeia de polimerase de metilação específica (PCR-MSP) e a PCR de metilação quantitativa específica em tempo real (PCR-QMSP). No momento da PCR, as uracilas são convertidas em timinas. Na amplificação por PCR há dois diferentes pares de *primers*, em que cada par reconhece especificamente as sequências metiladas (com as citosinas mantidas em suas posições originais), ou as sequências não metiladas (com timinas nos lugares das citosinas). Portanto, para detectar a metilação dos genes, o DNA das amostras teciduais e citológicas é tratado pelo bissulfato de sódio, para ocorrer a mudança dessas bases nitrogenadas.

Gene RASSF1A

O estudo de Cohen et al.⁶ (B), demonstrou a hipermetilação da região promotora do gene RASSF1A nos casos de adenocarcinoma (AC), e não teve frequência desse gene no carcinoma de células escamosas (CEC) do colo uterino. A relação entre a infecção por HPV e a inativação do RASSF1A

é importante no CC. A correlação observada entre a infecção por HPV 16 e a metilação RASSF1A em tumores primários de linhagem de células do CEC de cabeça e pescoço podem refletir uma interação funcional entre o RASSF1A e as proteínas virais (E6/E7)¹⁹ (B). Essa interação pode ter um desempenho importante, tanto na transformação neoplásica, quanto na imortalização de células epiteliais do colo uterino, embora não se tenha observado uma correlação entre a metilação do RASSF1A e a infecção por HPV 16 em AC do CC. A ausência de metilação RASSF1A no tipo histológico CEC de colo uterino, associada à elevada incidência de infecção por HPV 16 foi observada também no CEC de cabeça e pescoço¹⁹ (B). Estudos mais amplos são necessários para estabelecer a relação entre a metilação RASSF1A e a infecção pelo HPV 16 em CEC e AC do colo uterino.

Genes CDH1, DAPK, RAR β , HIC1, hTERT e SOCS2

No estudo de Narayan et al.⁷ (B), foi identificado um total de metilação em 87,8% dos casos de CC, e os genes metilados

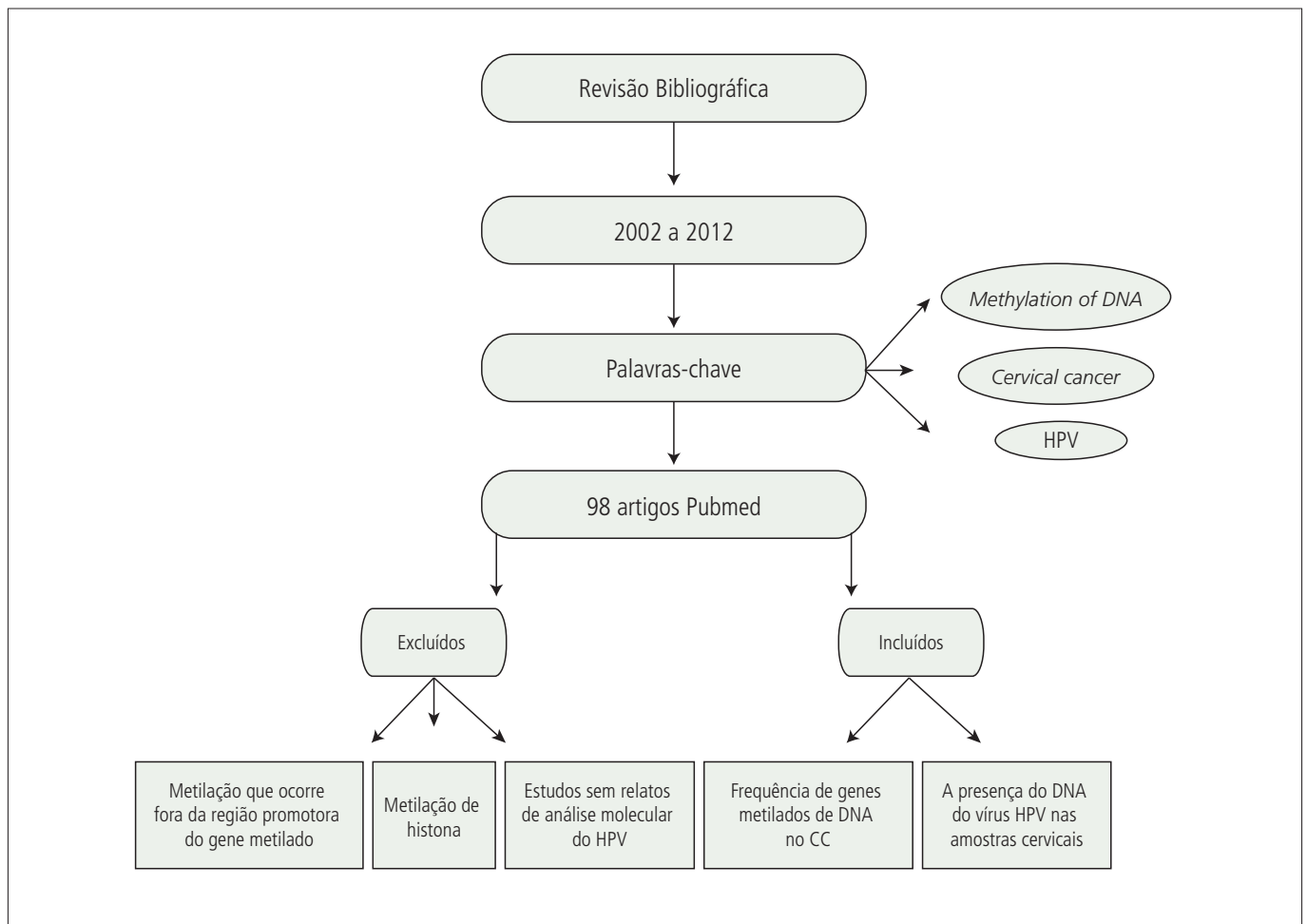


Figura 1 - Pesquisa bibliográfica e seleção dos artigos. HPV: papilomavírus humano; CC: câncer cervical.

Tabela 1 - Síntese dos resultados dos artigos revisados sobre metilação de DNA no câncer cervical e a presença de DNA do vírus do HPV

Autor	n	Gene(s) Estudado(s)	Resultados
Cohen et al. ⁶ (B)	n=51 CEC: 31 AC: 20	RASSF1A	Metilação em 45% dos casos de AC e sem metilação em 100% dos casos de CEC. Amostras de AC positivas para HPV 16 em 33%.
Narayan et al. ⁷ (B)	n=90 CEC: 77 AC: 05 Linhagem de células: 08	CDH1, DAPK, RAR β , HIC1, FHIT, RASSF1A, APC, CDKN2A, MGMT, BRCA1, TP73, TIMP3, GSTP1, MLH1, p14 ^{ARF} e RB1	CDH1, DAPK, RAR β , e HIC1 tiveram uma frequência elevada de metilação. O RAR β e o BRCA1 foram considerados marcadores de pior prognóstico. 95,6% das mulheres foram positivas para o HPV, sendo 61,1% do HPV 16 e 25,6% do HPV 18.
Widschwendter et al. ⁸ (B)	n=45 NIC I: 03 NIC II: 18 NIC III: 13 CC: 11	SOCS1, CDH1, TIMP3, GSTP1, DAPK, hTERT, CDH13, HSPA2, MLH1, RASSF1A e SOCS2	Aumento da metilação do DNA com a gravidade da lesão cervical, na região promotora dos 11 genes. 68 e 82% das mulheres tiveram respectivamente HSIL e CC e 100% das mulheres foram positivas para o HPV de alto risco oncogênico.
Eijsink et al. ⁹ (B)	n=43 CC: 20 NIC II: 15 NIC I: 08	JAM3, TERT, EPB41L3 e C13ORF18	Metilação em 95% que tiveram CC, 80% com NIC II e 0% com NIC I. O HPV de alto risco foi positivo em 80, 100 e 63% com CC, NIC II e NIC I, respectivamente.
Spathis et al. ¹⁰ (B)	n=403 CC: 340 Citologia normal: 63	p16 ^{INK4a} , MGMT e hMLH1	A positividade do HPV 16, 45, 53, 61, 68 foi correlacionada com a metilação na região promotora dos genes obtendo um p<0,001.
van der Meide et al. ¹¹ (B)	n=131 AC: 45 ACIS: 11 NIC III: 27 CEC: 28 Citologia normal: 20	APC, AXIN2, DKK3, SFRP2, SFRP4, SFRP5, SOX17, WIF1 e WNT5A	Frequência de DKK3 e SFRP2 foi maior nas mulheres com CEC. Frequências de metilação dos genes estudados com variação de 4 a 55% nas lesões precursoras e de 0 a 5% em biópsias normais. 58% das mulheres foram positivas para os HPV 16 e 18.
Missaoui et al. ¹² (B)	n=60 Tecidos normais: 08 Lesões benignas: 10 NIC I-III: 28 CEC: 14	CDH13, TWIST1, DAPK1 e p16 ^{INK4a}	CDH13, TWIST1 e DAPK1 foram os genes que sofreram a hipermetilação no início e na progressão da neoplasia cervical, sendo considerados como marcadores de CC. O HPV16 foi o mais frequente.
Eijsink et al. ¹³ (B)	n=190 CC: 84 Colo uterino normal: 106	JAM3, EPB41L3, C13ORF18, TERT, SLIT2_1, SOX1, JPH3, LMX1A, POMC, WT1_1, SLIT1, CDH4, TFPI2, ALX3, DKK2_1, DKK2_2, WT1_2, RPRM, SLIT2_2 e LOC285016	Metilação de JAM3, EPB41L3, C13ORF18 e TERT foi encontrada nos casos de CC. O HPV de alto risco foi detectado em 88% dos casos de CC.
Jha et al. ¹⁴ (B)	n=125 mulheres com CC	p16 ^{INK4a} , p14 ^{ARF} e p15 ^{INK4b}	O gene p16 ^{INK4a} foi o mais frequente com 36% de CC. A positividade do HPV 16 foi de 69,8%.
Patel et al. ¹⁵ (B)	n=151 mulheres com CC	ESR1, DCC, p16 e LINE1	Ocorreu metilação na região promotora dos genes ESR1 (p<0,001) e o DCC (p=0,002) nas mulheres positivas para o HPV 16.

n: número da população; CC: câncer cervical; CEC: carcinoma de células escamosas; AC: adenocarcinoma; ACIS: adenocarcinoma *in situ*; HPV: papilomavírus humano; NIC I: neoplasia intraepitelial cervical grau I; NIC II: neoplasia intraepitelial cervical grau II; NIC III: neoplasia intraepitelial cervical grau III; HSIL: lesão intraepitelial de alto grau.

RAR β e BRCA1 foram marcadores de pior prognóstico. Foi relatado também no estudo de Virmani et al.¹⁷ (B) que a frequência da metilação na região promotora dos genes foi de 72,4% nas mulheres com CC. A metilação dos genes CDH1, DAPK e RAR β foi maior em 25% dos casos, enquanto nos HIC1, FHIT, RASSF1A e APC foram menos frequentes nas mulheres com CC. Já nos genes CDKN2A, MGMT, BRCA1, TP73, TIMP3, GSTP1 e MLH1 a metilação foi menor em 10% dos casos⁷ (B).

Estudo tem mostrado que a perda da função do gene CDH1 ocorre nos tipos de tumores epiteliais por mecanismos mutacionais, ou hipermetilação da região promotora²⁰ (B). Outra pesquisa demonstrou que a perda de expressão do gene DAPK foi associada com o fenótipo metastático agressivo e em muitos tipos de tumores²¹ (B). Também foi relatado em outro estudo

a metilação do RAR β em 33,3% dos CC invasivos, 11% no NIC I e 29% no NIC III¹⁷ (B).

SOCS2 e CDH1 foram metilados em quase 25% das pacientes com lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), indicando que a metilação desses genes é um evento precoce na carcinogênese cervical, enquanto que a metilação de hTERT sugere um evento tardio⁸ (B).

Genes p16^{INK4A}, MGMT e hMLH1

A metilação de DNA aberrante que ocorre na região promotora dos genes MGMT, hMLH1 e p16^{INK4a} foi identificada em amostras citológicas do colo de útero¹⁰ (B). Em um estudo, a metilação do gene MGMT foi correlacionada com fatores de risco previamente reportados para as lesões graves

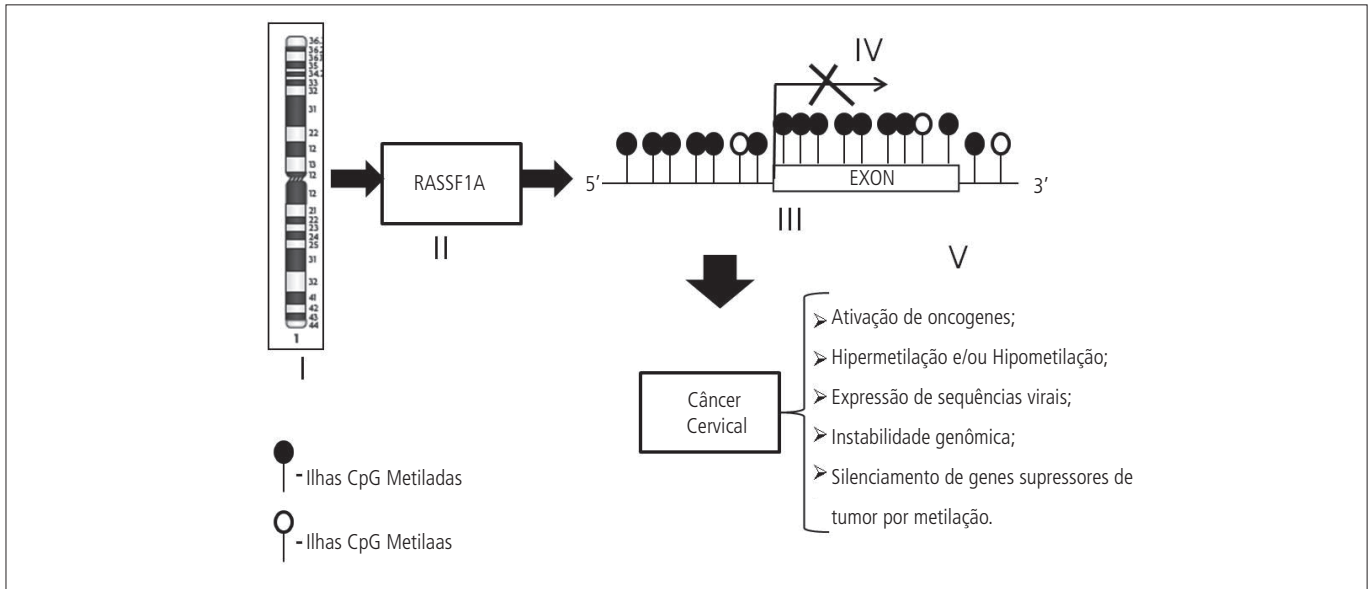


Figura 2 - Esquema com exemplo do gene RASSF1A no câncer cervical, demonstrando a metilação das ilhas CpG na região promotora do gene. I: Cromossomo; II: Exemplo do gene do câncer cervical; III: Região Promotora do gene; IV: Repressão transcricional; V: Mecanismos que ocorrem no câncer cervical.

do colo uterino²² (B), enquanto a metilação do hMLH1 foi correlacionada com os tipos de HPV de baixo risco.

Genes DKK3, SFRP2, SOX17 e WIF1

O estudo de van der Meide et al.¹¹ (B), por meio da análise QMSP-PCR, mostrou que DKK3, SFRP2 e SOX17 foram diferencialmente metilados em AC e CEC. Isso corrobora outro estudo, em que o APC e o SFRP5 metilados foram encontrados com mais frequência no AC, comparado com o CEC do CC²³ (B).

Genes CDH13, DAPK1 e TWIST1

No estudo de Missaoui et al.¹² (B), a hipermetilação da região promotora dos genes CDH13, DAPK1 e TWIST1 foi negativa em tecidos normais. No entanto, a hipermetilação desses genes foi detectada em lesões de NIC I, e aumentou com a severidade da neoplasia presente na biópsia cervical. Esses achados foram confirmados em relato anterior⁸ (B).

A perda da expressão do gene DAPK1 tem sido demonstrada em certo número de doenças malignas, incluindo o CC; principalmente, por hipermetilação e por aumento do potencial metastático de células cancerosas⁷ (B).

Metilação de DNA e câncer cervical

Tem sido claramente demonstrado que as alterações de metilação do DNA ocorrem na iniciação e na progressão do câncer, e podem servir como um marcador convincente de diagnóstico e prognóstico da doença humana²⁴ (B).

A hipermetilação do gene DAPK1 foi observada em 33,3% dos NIC I, 50% de NIC III, e 71,4% de amostras de CEC. Em outra investigação, a hipermetilação do DAPK1 foi observada em 2% do normal, 66% de NIC III e 100% dos casos de câncer²⁵ (B).

Metilação de DNA e HPV

Relatos mostraram que não houve correlação estatística significativa entre a positividade do HPV e a hipermetilação observada nas regiões promotoras dos genes. Acredita-se que a metilação de DNA aberrante em mulheres com ou sem infecção pelo HPV possa ajudar a identificar grupos em maior risco de progressão histológica, ou de desenvolvimento do CC^{7,8} (B).

Considerações Finais

A revisão bibliográfica identificou como genes metilados mais frequentes no CC, o CDH1, DAPK, RAR β , HIC1, DKK3, SFRP2, SOX17, WIF1, MGMT, hTERT e RASSF1A. Esses dados sugerem que os genes metilados podem desempenhar uma função significativa no início do câncer, e que a metilação de alguns genes está associada a um estágio avançado da doença. Esse conhecimento de metilação de DNA no CC pode ser útil para prever as neoplasias do colo do útero, evitar a progressão da doença e servir como alvo de tratamento.

Leituras suplementares

- Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2007;100(1):7-23.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52353-60.
- Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci.* 2010;101(2):300-5.
- Hawes SE, Stern JE, Feng Q, Wiens LW, Rasey JS, Lu H, et al. DNA hypermethylation of tumors from nonsmall cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer.* 2010;69(2):172-9.
- INCA-Instituto Nacional de Câncer [Internet]. Brasil. Colo do útero; Inc.; c1996-2012 [updated 2012 May 16; cited 2012 Abr 9]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio
- Cohen Y, Singer G, Lavie O, Dong SM, Beller U, Sidransky D. The RASSF1A tumor suppressor gene is commonly inactivated in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 2003;9(8):2981-4.
- Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Vilella J, et al. Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RAR β , and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer.* 2003;2(24):1-12.
- Widschwendter A, Gattlinger C, Ivarsson L, Fiegl H, Schneitter A, Ramoni A, et al. Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervico vaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clin Cancer Res.* 2004;10(10):3396-400.
- Eijsink JH, Yang N, Lendvai A, Klip HG, Volders HH, Buikema HJ, et al. Detection of cervical neoplasia by DNA methylation analysis in cervico-vaginal lavages, a feasibility study. *Gynecol Oncol.* 2011;120(2):280-3.
- Spathis A, Aga E, Alepaki M, Chranioti A, Meristoudis C, Panayiotides I, et al. Promoter methylation of p16^{INK4A}, hMLH1, and MGMT in liquid-based cervical cytology samples compared with clinicopathological findings and HPV presence. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011;2011:927861.
- van der Meide WF, Snellenberg S, Meijer CJLM, Baalbergen A, Helmerhorst TJM, van der Sluis WB, et al. Promoter methylation analysis of WNT/ β -catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2011;123(1):116-22.
- Missaoui N, Hmissa S, Trabelsi A, Traoré C, Mokni M, Dante R, et al. Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 2011;207(1):37-42.
- Eijsink JH, Lendvai A, Deregowski V, Klip HG, Verpooten G, Dehaspe L, et al. A four-gene methylation marker panel as triage test in highrisk human papillomavirus positive patients. *Int J Cancer.* 2012;130(8):1861-9.
- Jha AK, Nikbakht M, Jain V, Capalash N, Kaur J. p16(INK4a) and p15(INK4b) gene promoter methylation in cervical cancer patients. *Oncol Lett.* 2012;3(6):1331-5.
- Patel DA, Rozek LS, Colacino JA, Zomeren-Dohm AV, Ruffin MT, Unger ER, et al. Patterns of cellular and HPV 16 methylation as biomarkers for cervical neoplasia. *J Virol Methods.* 2012;184(1-2):84-92.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128(4):683-92.
- Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoehbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2001;7(3):584-9.
- Jones PA. DNA methylation errors and cancer. *Cancer Res.* 1996;56(11):2463-7.
- Dong MS, Sun DI, Benoit EN, Lerman IM, Sidransky D. Epigenic inactivation of RASSF1A in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3635-40.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3225-9.
- Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Preferential loss of death associated protein kinase expression in invasive pituitary tumors is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene.* 2002;21(8):1217-24.
- Tsoumpou I, Valasoulis G, Founta C, Kyrgiou M, Nasioutziki M, Da Ponte A, et al. High-risk human papillomavirus DNA test and p16^{INK4a} in the triage of LSIL: a prospective diagnostic study. *Gynecol Oncol.* 2011;121(1):49-53.
- Lin YW, Chung MT, Lai HC, De Yan M, Shih YL, Chang CC, et al. Methylation analysis of SFRP genes family in cervical adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009;135(12):1665-74.
- Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, Wang SS. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol.* 2009;112(2):293-9.
- Kahn SL, Ronnett BM, Gravitt PE, Gustafson KS. Quantitative methylation specific PCR for the detection of aberrant DNA methylation in liquid-based Pap tests. *Cancer.* 2008;114(1):57-64.