

Dossier

Premio “Fundación Florencio Fiorini Año 2008”

**PERFIL DE METILACIÓN TUMORAL
COMO BIOMARCADOR PARA CÁNCER DE MAMA**

Diego Marzese¹, Gago Francisco², Javier Orozco³, Olga Tello⁴, Laura Vargas Roig⁵, María Roqué⁶

¹ Docente de Genética FCM, UNCuyo.

² Profesor Titular de Ginecología y Obstetricia, FCM, UNCuyo.

³ Docente de Ginecología y Obstetricia. FCM. UNCuyo.

⁴ Profesor Titular de Anatomía y Fisiología Patológica, Facultad de Odontología, UNCuyo.

⁵ Docente de Histología y Embriología. FCM. UNCuyo.

⁶ Profesor adjunto de Genética, ICB, UNCuyo. IHEM CCT CONICET. Mendoza.

Contacto: María Roqué Moreno. Tel 0054 261 4494143 - Fax 0054 261 4494117 -

<mroque@fcm.uncu.edu.ar

Introducción

El cáncer es una enfermedad heterogénea y la genética clásica no alcanza para explicar las diferentes manifestaciones de la enfermedad ni el impacto del medio ambiente sobre la carcinogénesis. Los procesos que regulan la expresión de genes sin alterar la secuencia de los mismos son denominados procesos *epigenéticos*. En el desarrollo tumoral coexisten alteraciones genéticas y epigenéticas, que modifican la expresión de genes. En las células mamíferas los cambios epigenéticos son heredables, consisten en la metilación del carbono de la posición 5 de citosinas presentes en dinucleótidos CG (llamados islas CpG) y se encuentran concentrados en promotores de genes¹. La metilación de las islas CpG representa una señal que desencadena un cambio en la cromatina, que impide la transcripción del gen². En un estado normal, la metilación es un mecanismo que regula, entre otros procesos, la diferenciación de tejidos al silenciar ciertos genes en determinados tejidos. Pero cuando la metilación se desregula y afecta genes que no deben ser silenciados, puede iniciarse un proceso patológico. La metilación aberrante de genes supresores de procesos tumorales (GST) provoca un descontrol del ciclo celular, así como la metilación aberrante de genes inhibidores de metástasis, facilita el escape de la célula tumoral³. La consecuencia de esta metilación desregulada tiene un efecto comparado al que produce una mutación en la secuencia codificante del gen⁴.

Se ha propuesto que la metilación de los GST es progresiva a lo largo del proceso tumoral⁵ detectándose una mayor presencia de GST metilados en líneas celulares⁶. El número de GST que se reportan metilados en cáncer aumenta día a día. Entre éstos encontramos algunos como RASSF1-A, E-Caderina, APC, GSTP1, p16, BRCA1, p14, hMLH1, p53, RB y VHL⁷.

Basados en estos datos planteamos que la determinación de alteraciones epigenéticas específicas de un tumor permitiría identificar etapas del proceso

carcinogénico, como también establecer el grado o estadio de la enfermedad y que podría aportar información para proponer tratamientos más personalizados. Por otro lado, analizamos la posibilidad de detectar células tumorales en la circulación sanguínea, ya que el perfil de metilación de las células sanguíneas normales no interfiere en la detección del perfil encontrado en el tumor⁸. Esto podría permitir el seguimiento de la enfermedad, la respuesta al tratamiento y la posibilidad de realizar diagnósticos periódicos para detectar casos de recidivas. En definitiva pensamos que el perfil de metilación presente en el tumor puede ser utilizado como un biomarcador de la enfermedad.

Para demostrar la influencia de las alteraciones epigenéticas en la carcinogénesis y establecer el perfil de metilación, se analizaron 26 regiones genómicas previamente relacionadas con cáncer humano (tabla 1). A su vez se estudiaron cambios en el número de copias (ganancias o pérdidas) de 15 regiones más (tabla 2). Se analizó el perfil de metilación de 14 tumores de tejido mamario, 4 ganglios con metástasis, 6 tejidos no neoplásicos del límite de seguridad quirúrgica y 2 patologías mamarias benignas. Los patrones de metilación y cambios de número de copias de todas las regiones fueron estudiados mediante la metodología molecular MS-MLPA (Methyl Specific – Multiplex Ligation dependent Probe Amplification)⁹. Nuestro grupo trabaja desde el 2005 con diferentes aplicaciones de esta metodología^{10,11}. Los resultados fueron confirmados con las técnicas basadas en el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio seguido de PCR anidada (Methyl Specific PCR o MSP) y secuenciación dependiente de bisulfito (Bisulfite Sequencing PCR o BSP)¹².

Metodología

Pacientes

Las pacientes incluidas en el estudio manifestaron previamente su aceptación mediante la firma de un consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo. Todas las pacientes fueron operadas por el servicio de ginecología y obstetricia del Hospital Italiano de Mendoza y del Instituto Gineco-Mamario (IGM) de Mendoza, en el período comprendido entre octubre de 2006 a mayo de 2008.

Al momento se han incluido 96 pacientes y un total de 235 muestras. Las edades de las pacientes comprenden un rango de 29 a 86 años, con una edad media de 55,32 años. Los tumores incluidos presentan diferentes tipos, grados y estadios patológicos (tabla 3).

Recolección de muestras

Se realizó la extracción de 3ml de sangre venosa periférica previo a la cirugía utilizando como anticoagulante 25µl de EDTA 0,5M (n=77). Luego de la extracción del tejido tumoral y la exanimación anatomopatológica, se procedió a la disección, separación y congelamiento (-80°C) de tejido tumoral (n= 90), tejido ganglionar (n=32) y tejido no neoplásico (n=24).

Grupo Etáreo (años)	Porcentaje (%)
26-30	2,6
31-35	2,6
36-40	7,8
41-45	10,4
46-50	18,2
51-55	14,3
56-60	13,0
61-65	5,2
66-70	10,4
71-75	5,2
76-80	6,5
81-85	2,6
85-90	1,3

Tipo tumoral	Porcentaje (%)
Ca. Invasor Tubular	4,55
Ca. Invasor con Metaplasia	4,55
Metástasis	4,55
Carcinoma Ductal In Situ	9,09
Ca. Invasor Lobulillar	9,09
Fibroadenoma	13,64
Ca. Ductal Infiltrativo	13,64
Ca. Ductal Invasor	40,91

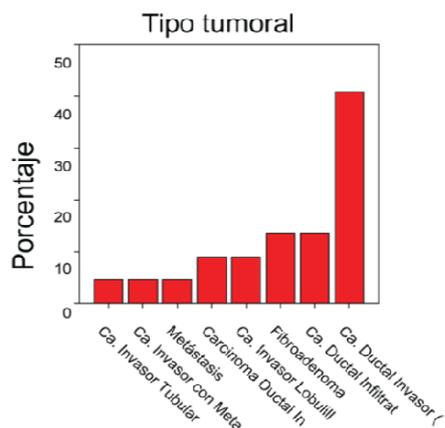
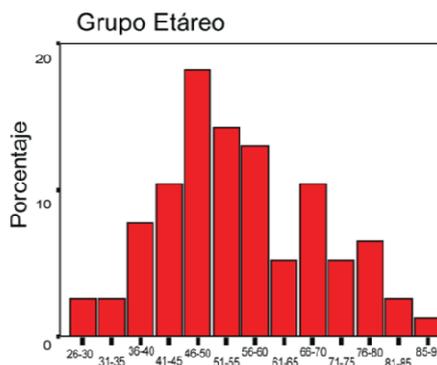


TABLA 3: Detalle de la muestra: edades de las pacientes y grado de la patología mamaria.

Extracción de ADN

Extracción de sangre venosa periférica

Previo a la aplicación de anestésicos en cada cirugía se procedió a la extracción de 3 ml de sangre venosa. La extracción de ADN se realizó de leucocitos de sangre periférica con el método CTAB. La hebra de ADN fue re suspendida en 1ml de Buffer T₁₀E (Tris/HCl 10mM y EDTA 1mM) y almacenado a -20°C.

Extracción de tejidos

Para evitar la contaminación, los tejidos tumorales, linfoides y no neoplásicos fueron procesados por separado. Cada uno fue crio preservado a -80°C y fue disgregado con el uso de un mortero congelado a -80°C. La suspensión celular fue congelada a -20°C por 24hs para facilitar la ruptura de membranas y la extracción de ADN fue realizada mediante CTAB, modificando los tiempos de incubación para asegurar una

correcta disolución. La hebra de ADN fue re suspendida en 1ml de Buffer T₁₀E (Tris/HCl 10mM y EDTA 1mM) y almacenado a -20C.

Methyl-Specific Multiplex Ligation Probe dependend Amplification

Las muestras de ADN fueron cuantificadas y diluidas en buffer TE a una concentración de 300ng/μl. La reacción de MS-MLPA se realizó de acuerdo a las recomendaciones de MRC-HOLLAND (<http://www.mrc-holland.com/pages/me001pag.html>). Las muestras de ADN y la mezcla de pares de sondas específicas para las regiones analizadas fueron hibridadas mediante una incubación durante toda la noche a 60°C. A continuación, los pares de sondas fueron ligadas entre sí e incubadas luego con la enzima de restricción CfoI (sensible a la presencia de metilación). Luego los productos ligados que no hubieren sido digeridos, fueron amplificados por PCR con un cebador con marca fluorescente. Los fragmentos resultantes fueron analizados por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI3130 de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo.

Conversión con bisulfito de sodio

El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Herman¹² con algunas modificaciones. Dos μg de ADN disueltos en 50 μl de buffer TE (10:1) fueron desnaturalizados durante 15 min a 37°C NaOH (Conc. final 0,2M). Luego se agregaron 30 μl de hidroquinona (Sigma-Aldrich H9003) 10mM durante 10 min y 230μl de bisulfito de sodio (Sigma-Aldrich) 5M ph=5 por 16 horas a 50°C. El segundo día se realizo el desalado de la solución con Gel Extraction Kit (150) QIAEXII según recomendaciones del fabricante (Quiagen GmbH Germany). Luego se realizo la desulfonacion con NaOH (Conc. final 0,3M), se neutralizo con acetato de sodio 3M y precipito con 500 μl de etanol 100%.

MSP anidada y secuenciación dependiente de bisulfito (BSP)

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del método de detección de metilación de la isla CpG del promotor del gen RASSF1A, se diseñó una estrategia de PCR anidada. El procedimiento consistió en una primer ronda de amplificación de 3µl de ADN convertido con bisulfito de sodio en una mezcla de PCR conteniendo buffer GoTaq Green (Promega) 1x, 2,5Unidades de GoTaq Polimerasa(Promega), 1,5mM de cada dNTPs, 2,5mM de Cloruro de Magnesio, 0,5µM de cebador E1 y 0,5µM de cebador E2 (tabla 4). El producto de esta reacción mide 200 pb y fue utilizado como templado para dos reacciones posteriores: una utilizando los cebadores UN-F y UN-R y otra utilizando los cebadores Met-F y Met-R Sobre estos productos (de 147 pb y 111 pb respectivamente) se realizó una secuenciación automática utilizando los cebadores correspondientes en cada caso Rassf Met y Rassf UN (Tabla 4 y Figura 4C y 4D)

Nombre del ceador	Secuencia (5`3`)
Rassf E1	GGGTTTTATAGTTTTTGTATTTAGGTT
Rassf E2	GGGGAGTTTGAGTTTATTGAGTT
Rassf UN F	TGTGTGGTTTTTTTTAGTTTTTTTTGTTG
Rassf UN R	TGGGTTTAATTGGGTTATGTTGGG
Rassf Met F	CGGTTTTTTTTAGTTTTTTTCGTCTG
Rassf Met R	TCGCGTTTGTAGCTTTAAAGTTA

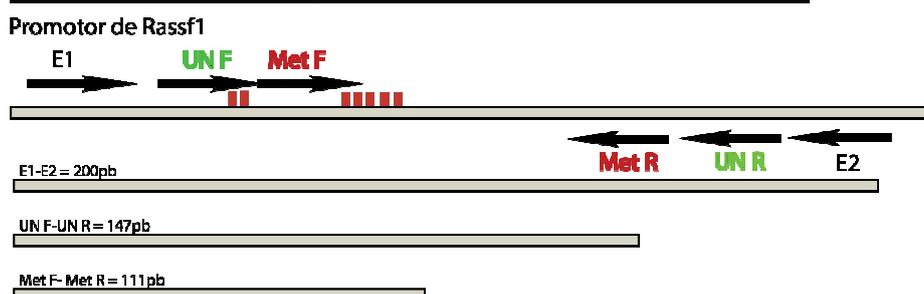


TABLA 4: Secuencia de los cebadores utilizados. Esquema de la estrategia PCR anidada y resultado esperado de las amplificaciones.

Resultados

Detección de metilación en regiones relacionadas con la carcinogénesis.

En todos los tumores mamarios analizados (n = 13) se encontraron alteraciones epigenéticas relacionadas con la tumorigénesis (Figura 1-A y B). En patologías mamarias benignas y en tejido mamarios no neoplásicos no se detectaron alteraciones en la metilación de las regiones estudiadas. (Figura. 1- C). Cabe mencionar una excepción: en la muestra **no-neoplásica** (CMN5 (1)) se detectó un perfil de metilación aberrante. Es interesante observar que si bien esta muestra era anatomopatológicamente normal, poseía un alto riesgo de presentar o desarrollar un tumor ya que, al momento de la cirugía, se encontraba alojada entre dos focos tumorales en la mama de la paciente.

Perfiles de metilación aberrante específicos para cada tumor.

En todos los tumores se encontró metilación en al menos dos regiones relacionadas con la patología tumoral (Figura 1.B). Esto permitió establecer diferencias entre los tumores basados en los genes metilados en cada caso, lo que denominamos perfil de metilación tumoral (PMT) o perfil de metilación ganglionar (PMG). A pesar de que varias de las muestras analizadas pertenecen a tumores de mama del mismo origen histológico, en ninguno de los casos el PMT fue el mismo (Figura 1.B), poniendo de manifiesto la heterogeneidad que presenta la patología a nivel molecular y la posibilidad de identificar la presencia de un tumor mediante su perfil específico. En la Figura 2 se presentan la frecuencia de los genes metilados en tumores de mama, y los perfiles de metilación ganglionar.

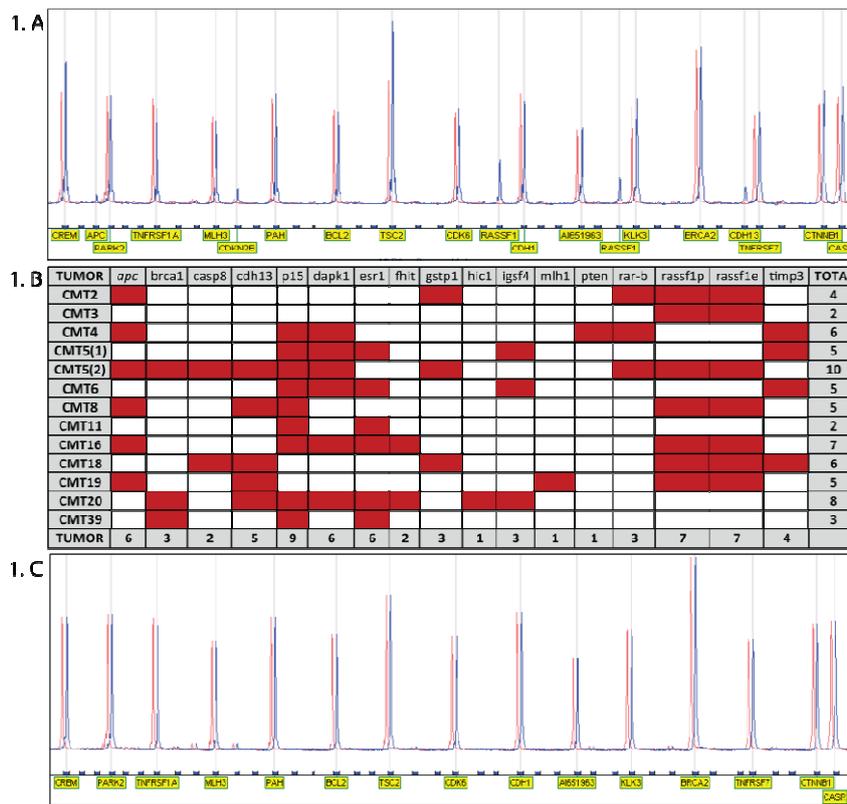


Figura 1: Análisis de la metilación de diferentes genes. 1. A: Comparación de electroferogramas obtenidos mediante análisis con el software GeneMarker v1.75. En rojo se muestra el perfil correspondiente al control sano y en azul se muestra el perfil correspondiente al tumor de la paciente 8 (CMT8). El tumor presenta metilación aberrante en los genes APC, CDKN2B (o p15), promotor y exón 1 de RASSF1A y CDH13. 1. B: Tabla que resume los resultados encontrados en los tumores analizados. En la columna derecha se muestra la cantidad de genes metilados por muestra y en la fila inferior la frecuencia en la que se ha encontrado un mismo gen metilado. 1. C: Comparación de electroferogramas: en rojo el control sano y en azul el tejido no neoplásico. Observe la ausencia de metilación aberrante en el tejido no neoplásico.

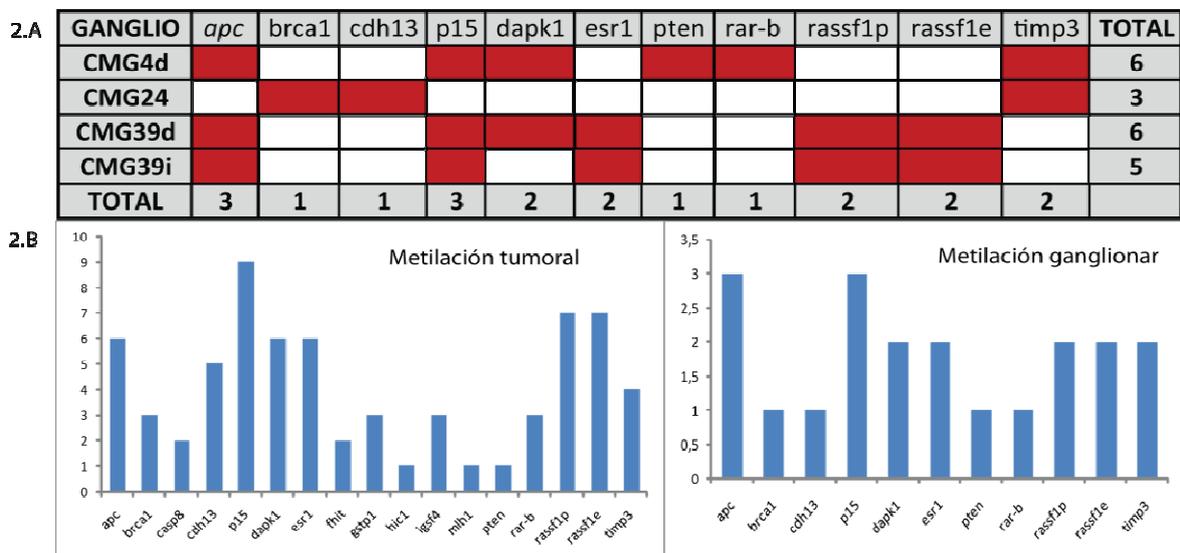


Figura 2: Frecuencia de genes metilados en tumores y ganglios centinelas: 2.A: Tabla que resume los genes metilados hallados en ganglios afectados. **2.B:** Frecuencia de genes metilados en tumores. **2. C:** Frecuencia de genes metilados en ganglios centinelas

Correlación del PMT con PMG

Los casos que presentaron un compromiso del ganglio fueron particularmente estudiados, para determinar epigenéticamente el origen de la metástasis en los ganglios. La paciente CM4 presentaba una patología mamaria bilateral, definida por la presencia de dos tumores ductales invasores. En la mama izquierda se encontró un PMT para los genes TIMP3, MLH1, ATM, CDKN2B (o p15), HIC1, BRCA1, CASP8, CD44, promotor y primer exón de RASSF1, DAPK1, ESR1 e IGSF4. En la mama derecha se encontró un PMT que involucra los genes, TIMP3, APC, CDKN2B (o p15), RARB, DAPK1 y PTEN. El análisis del PMG mostró el compromiso de los mismos 6 genes encontrados en el PMT derecho, lo que permitió establecer claramente el origen de la metástasis presente en el ganglio, además de postular que entre los genes involucrados algunos pueden estar involucrados en el proceso de metástasis cercana.

Por otro lado, la paciente CM39 presentaba un tumor en la mama izquierda y dos focos de metástasis en axila, uno de ellos comprometía la axila izquierda, el otro la axila derecha. Nuestra pregunta era si las metástasis de ambos ganglios correspondían a un solo tumor de la mama izquierda o si existía otro foco tumoral oculto. Al comparar el PMT de la mama izquierda (p15, BRCA1y ESR1) con el PMG izquierdo (APC, p15, promotor y primer exón de RASSF1 y ESR1) se observó que compartían 2 genes, y que el PMG izquierdo presentaba el compromiso de 2 genes adicionales. Una explicación posible para esto es una evolución de la metilación aberrante que favoreció el escape de células con ese perfil hacia el ganglio. Al comparar el PMG izquierdo con el PMG derecho, se observó una coincidencia en los

genes comprometidos (Figura 3). Este sorprendente hallazgo lleva a especular que la metástasis en el ganglio derecho provino originalmente de células escapadas del ganglio izquierdo.

Muestra	<i>apc</i>	<i>brca1</i>	<i>p15</i>	<i>dapk1</i>	<i>esr1</i>	<i>pten</i>	<i>rar-b</i>	<i>rassf1p</i>	<i>rassf1e</i>	<i>timp3</i>	TOTAL
CMT4d	■		■	■		■	■			■	6
CMG4d	■		■	■		■	■			■	6
CMT39		■	■		■						3
CMG39d	■		■	■	■			■	■		6
CMG39i	■		■		■			■	■		5

Figura 3: Comparación de los Perfiles de metilación: CMT4d representa el PMT del tumor en la mama derecha de la paciente 4, CMG4d representa el PMG del ganglio centinela de la axila derecha de la paciente 4. CMT39 es el PMT de la paciente 39; CMG39d y CMG39i representan los PMG de los ganglios centinelas de la axila derecha e izquierda, respectivamente. Observese la coincidencia exacta de los perfiles de metilación aberrante, permitiendo inferir el origen de las metástasis en ganglio.

Detección de células tumorales circulantes.

Luego de establecer el PMT específico en cada paciente se planteo detectar este perfil en las células presentes en la sangre periférica pre-quirúrgica, ya sea como ADN libre de células o células tumorales circulantes (CTCs). Mediante los ensayos de MS-MLPA previamente utilizados no se detecto la presencia del PMT o PMG en la sangre de ninguna de las pacientes (Figura 4.A). Esto podía deberse por un lado, a que no se encontraba ADN tumoral circulando en la sangre de las pacientes analizadas, o a que la técnica empleada no era lo suficientemente sensible para detectar bajas concentraciones de ADN tumoral. Impulsados por diferentes trabajos que reportan la presencia de ADN tumoral en la circulación^{8,13} decidimos diseñar una estrategia de detección más sensible, adaptando la técnica MSP para aumentar su sensibilidad, a la que llamamos MSP anidada. Con la información del PMT, se eligió una región metilada en el tumor (promotor de RASSF1A) para utilizarla en la detección de ADN tumoral en la sangre pre-quirúrgica.

Al estudiar mediante MSP anidada las muestras de sangre pre-quirúrgicas de pacientes cuyo promotor RASSF1A había sido hallado metilado en el tumor, se pudo detectar esta misma alteración en la sangre. Los controles utilizados fueron obtenidos de individuos no oncológicos. (Figura 4.B). Los resultados obtenidos por MSP anidada fueron confirmados mediante la secuenciación de cada producto (RUN y RMet), observándose la presencia de metilación al persistir las islas CpG (ver barras en figura 4.C y 4.D).

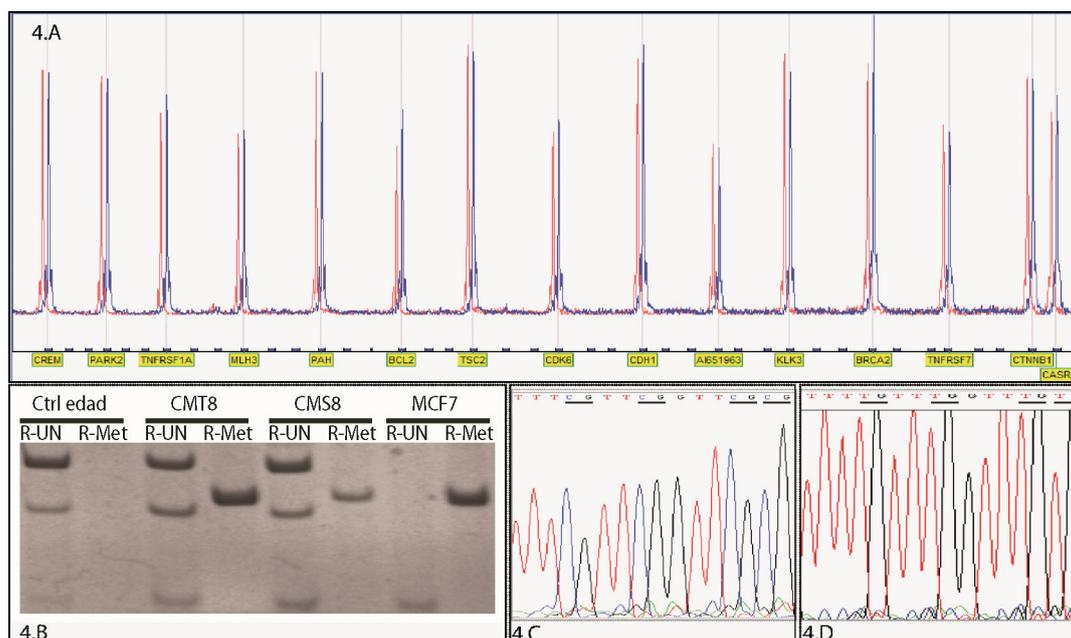


Figura 4: Detección del PMT o PMG en sangre pre quirúrgica: 4. A: electroferograma del análisis MS-MLPA de la sangre de la paciente 8 (CMS8). En rojo vemos el resultado del control sano y en azul el resultado de CMS8. Como se puede observar, no se observa diferencia alguna. **4. B:** Electroforesis en gel de los productos de MSP anidada. Las calles R-UN corresponden a la amplificación de alelos del promotor Rassf1 no metilados (147pb), las calles R-Met corresponden a la amplificación de alelos del promotor Rassf1 metilados (111pb), CMT8 es ADN obtenido del tumor de la paciente 8, CMS8 es ADN obtenido de la sangre pre quirúrgica de la paciente 8, MCF7 es ADN obtenido de una línea celular de cáncer de mama y Ctrl edad es ADN obtenido de personas con edad similar a la paciente 8 y sin antecedentes oncológicos. Observese que en la sangre de la paciente se observa metilación aberrante (calle CMS8, R-Met) igual que en el tumor (CMT8, R-Met). **4. C:** Secuenciación del alelo de Rassf1 metilado y **4. D:** Secuenciación del alelo de Rassf1 no metilado. Note la presencia de bases CG en la muestra metilada, que desaparecen en la muestra no-metilada.

Conclusiones

La metilación de las regiones genéticas analizadas es específica para muestras tumorales dado que no fue detectada en tejido sano ni en patologías mamarias benignas, como fibroadenomas. Esto permite especular que estas regiones están efectivamente relacionadas con procesos tumorigenicos mamarios. Es interesante destacar el tejido CMN4, en el cual se halló metilación aberrante y anatómo-patológicamente fue considerado normal. Esto podría estar revelando que si bien histológicamente el tejido parece sano, a escala molecular el proceso oncológico ya ha comenzado y representa un riesgo de desarrollar un crecimiento tumoral.

Al establecer la metilación de 26 regiones genéticas se pudieron establecer *perfiles* o *firmas* epigenéticas específicas de cada muestra tumoral. Esto no es posible si se analizan unas pocas regiones. Cuantos más genes se incluyen para caracterizar el perfil de metilación, mayor correlación se puede establecer con el tipo tumoral. Nuestros siguientes desafíos están centrados en estudiar la correlación entre los perfiles de metilación hallados y distintos rasgos clínico-patológicos.

La detección de ADN tumoral circulante (ADNtc) en sangre pre-quirúrgica consideramos que es de gran importancia clínica. No está del todo claro el mecanismo por el cual el ADNtc llega a la circulación. Algunos trabajos indican que es producto de la muerte celular programada mientras que otros trabajos lo vinculan a una secreción activa de las células tumorales^{14,15}. El descubrimiento de ácidos nucleicos libres en la circulación sanguínea fue reportado por primera vez en 1948 por los investigadores franceses Mandel y Métais y no se le dio la importancia correspondiente hasta la década del 70¹⁶.

La limitación de nuestro hallazgo basado en MSP anidada es que detectamos *una sola región* metilada en representación del perfil tumoral completo. Nuestro siguiente desafío está centrado en detectar en sangre el perfil de metilación tumoral completo.

Para esto, trabajamos en mejorar la sensibilidad de MS-MLPA para detectar el perfil aberrante de 1 célula tumoral entre decenas de miles de células normales. Junto con los análisis de correlación entre los perfiles tumorales y los rasgos clínico-patológicos, esto permitiría a futuro establecer estrategias terapéuticas más personalizadas y preventivas.

Referencias bibliográficas

- 1- Gardiner-Garden, M.; Frommer, M. CpG Islands in Vertebrate Genomes. *J. Mol. Biol.* 1987, *196*, 261-282.
- 2- Ordway, J. M.; Curran, T. Methylation Matters: Modeling a Manageable Genome. *Cell Growth Differ.* 2002, *13*, 149-162.
- 3-Mehrotra, J.; Vali, M.; McVeigh, M.; Kominsky, S. L.; Fackler, M. J.; Lahti-Domenici, J.; Polyak, K.; Sacchi, N.; Garrett-Mayer, E.; Argani, P.; Sukumar, S. Very High Frequency of Hypermethylated Genes in Breast Cancer Metastasis to the Bone, Brain, and Lung. *Clin. Cancer Res.* 2004, *10*, 3104-3109.
- 4- Dammann, R.; Takahashi, T.; Pfeifer, G. P. The CpG Island of the Novel Tumor Suppressor Gene RASSF1A Is Intensely Methylated in Primary Small Cell Lung Carcinomas. *Oncogene* 2001, *20*, 3563-3567.
- 5- Jones, P. A.; Laird, P. W. Cancer Epigenetics Comes of Age. *Nat. Genet.* 1999, *21*, 163-167.
- 6- Paz, M. F.; Fraga, M. F.; Avila, S.; Guo, M.; Pollan, M.; Herman, J. G.; Esteller, M. A Systematic Profile of DNA Methylation in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res.* 2003, *63*, 1114-1121.
- 7- Esteller, M. CpG Island Hypermethylation and Tumor Suppressor Genes: a Booming Present, a Brighter Future. *Oncogene* 2002, *21*, 5427-5440.
- 8- Cristofanilli, M.; Hayes, D. F.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Reuben, J. M.; Doyle, G. V.; Matera, J.; Allard, W. J.; Miller, M. C.; Fritsche, H. A.; Hortobagyi, G. N.; Terstappen, L. W. Circulating Tumor Cells: a Novel Prognostic Factor for Newly Diagnosed Metastatic Breast Cancer. *J Clin. Oncol.* 2005, *23*, 1420-1430.
- 9- Nygren, A. O.; Ameziane, N.; Duarte, H. M.; Vijzelaar, R. N.; Waisfisz, Q.; Hess, C. J.; Schouten, J. P.; Errami, A. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): Simultaneous

Detection of CpG Methylation and Copy Number Changes of Up to 40 Sequences. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, e128.

10- Marzese, D. M.; Mampel, A.; Gomez, L. C.; Echeverria, M. I.; Vargas, A. L.; Ferreiro, V.; Giliberto, F.; Roque, M. Detection of Deletions and Duplications in the Duchenne Muscular Dystrophy Gene by the Molecular Method MLPA in the First Argentine Affected Families. *Genet Mol. Res.* 2008, 7, 223-233.

11- Gomez, L. C.; Marzese, D. M.; Adi, J.; Bertani, D.; Ibarra, J.; Mol, B.; Vos, I. J.; De, M. G.; Roque, M. MLPA Mutation Detection in Argentine HNPCC and FAP Families. *Fam. Cancer* 2009, 8, 67-73.

12- Herman, J. G.; Graff, J. R.; Myohanen, S.; Nelkin, B. D.; Baylin, S. B. Methylation-Specific PCR: a Novel PCR Assay for Methylation Status of CpG Islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1996, 93, 9821-9826.

13- Widschwendter, A.; Muller, H. M.; Fiegl, H.; Ivarsson, L.; Wiedemair, A.; Muller-Holzner, E.; Goebel, G.; Marth, C.; Widschwendter, M. DNA Methylation in Serum and Tumors of Cervical Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 565-571.

14- Fournie, G. J.; Courtin, J. P.; Laval, F.; Chale, J. J.; Pourrat, J. P.; Pujazon, M. C.; Lauque, D.; Carles, P. Plasma DNA As a Marker of Cancerous Cell Death. Investigations in Patients Suffering From Lung Cancer and in Nude Mice Bearing Human Tumours. *Cancer Lett.* 1995, 91, 221-227.

15- Rogers, J. C.; Boldt, D.; Kornfeld, S.; Skinner, A.; Valeri, C. R. Excretion of Deoxyribonucleic Acid by Lymphocytes Stimulated With Phytohemagglutinin or Antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1972, 69, 1685-1689.

16- Mándel, P.; Métais, P. Les Acides Nucléiques Du Plasma Sanguin Chez L'Homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1948, 142, 241-243.