



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Efecto de la metilación de la LCR en la actividad
transcripcional del VPH16.**

T E S I S

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

**P R E S E N T A:
ISMENE LILIANA HERNÁNDEZ TOLEDO**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Berenice Illades Aguiar
CODIRECTOR DE TESIS: Dr. Daniel Hernández Sotelo**

Chilpancingo, Gro., Enero de 2015.

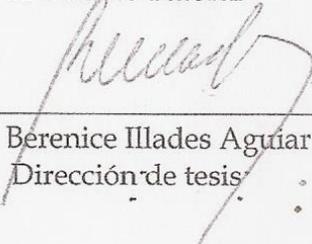


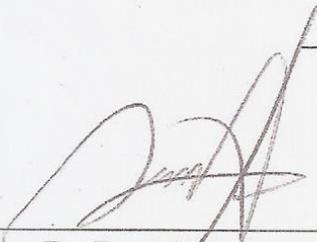
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
 UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
 UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

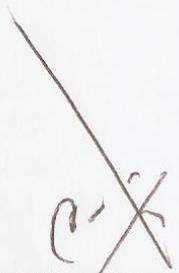
APROBACIÓN DE TESIS

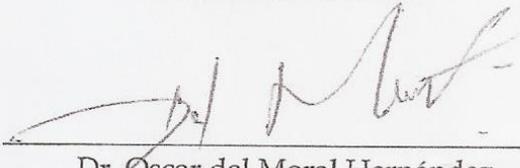
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 28 días del mes de noviembre de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de la metilación de la LCR en la actividad transcripcional del VPH16", presentada por la alumna Ismene Liliana Hernández Toledo, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

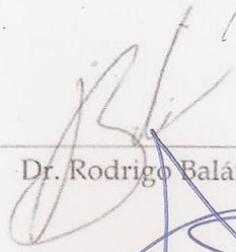
El Comité Tutorial


 Dra. Berenice Illades Aguiar
 Dirección de tesis

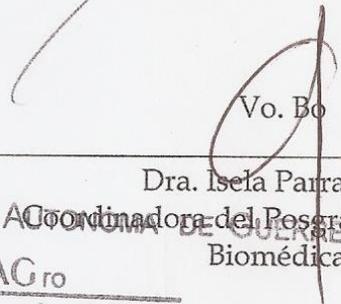

 Dr. Daniel Hernández Sotelo
 Codirección de tesis

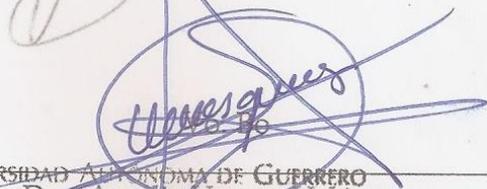

 Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


 Dr. Oscar del Moral Hernández


 Dr. Rodrigo Balám Muñoz Soto

Vo. Bo


 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas


 Dra. Amalia Vences Velázquez
 Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Efecto de la metilación de la LCR en la actividad transcripcional del VPH16.

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

Bajo la dirección de

Dra. Berenice Illades Aguiar

La codirección de

Dr. Daniel Hernández Sotelo

La asesoría de

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dr. Rodrigo Balám Muñoz Soto

Parte de este proyecto fue financiado por UAGro 2013, proyectos internos.

Esta investigación fue financiada con beca para el estudiante por el CONACyT durante dos años, la cual es otorgada a estudiantes inscritos en posgrados afiliados al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco también a mis sinodales, Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero, Dr. Oscar del Moral Hernández y Dr. Rodrigo Balám Muñoz Soto, por sus importantes aportaciones y sugerencias durante el desarrollo del presente trabajo.

Al M.C. Néstor Arroyo Ayala, el mejor amigo, por apoyarme siempre y darme el ánimo que necesitaba para seguir intentando, a mis amigos y compañeros de laboratorio, QBP. Natividad Sales Linares, M.C. Israel Torres Rojas, QBP. Hober Núñez Martínez y QBP. Genaro Salmerón Bárcenas, por la ayuda que me brindaron al realizar mis experimentos.

Dedico este trabajo con todo mi amor a las personas más importantes en mi vida:

Fidel Hernández Meza y Lizandra Toledo Jbarra

Azael Hernández Toledo y Jonas Hernández Toledo

Levíth Serrano Luna.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	i
II.	ABSTRACT	ii
III.	INTRODUCCIÓN	1
IV.	MATERIAL Y METODOS	4
V.	RESULTADOS	8
VI.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	13
VII.	REFERENCIAS	16

I. RESUMEN

Antecedentes: Evidencias experimentales y epidemiológicas indican que el CaCU es causado por la infección persistente con VPH de alto riesgo. El genotipo16 es el más comúnmente detectado en CaCU. Los oncogenes E6 y E7 explican en gran medida el potencial oncogénico de los VPH de alto riesgo. En la regulación de la expresión de E6 son importantes la proteína viral E2 y la LCR. Recientemente varios trabajos indican que la metilación de CpGs presentes en la LCR podrían tener un papel potencial en la regulación de la expresión de genes virales. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la metilación de la LCR en la actividad transcripcional del VPH16. **Material y métodos:** Analizamos la metilación del fragmento 3' de la LCR del VPH16 por modificación-secuenciación, valoramos por RT-qPCR el nivel de RNAm de E6 del VPH16 en muestras sin LEI y en CaCU y además analizamos el papel de la metilación *in vitro* y por DNMT3B en la actividad transcripcional del VPH16 en la línea celular C-33A. **Resultados:** No encontramos metilación en el fragmento de la LCR del VPH16 analizado tanto en muestras sin LEI como en las muestras de CaCU. El nivel del RNAm de E6 fue más alto en las muestras de CaCU que en las muestras sin LEI. La metilación *in vitro* de la LCR del VPH16 y el aumento de los niveles de DNMT3B disminuye gradualmente la actividad transcripcional del VPH16. **Conclusiones:** El nivel del RNAm de E6 del VPH16 es más alto en CaCU que en citología cervical normal. La metilación *in vitro* de la LCR del VPH16 disminuye su actividad transcripcional en C-33A. La sobre-expresión de DNMT3B1 afecta de manera negativa la actividad transcripcional de la LCR del VH16.

Palabras clave: Metilación del DNA, Región Larga de Control (LCR), VPH16.

II. ABSTRACT

Background: Experimental and epidemiological evidence suggests that CaCU is caused by persistent infection with high-risk HPV. Genotype 16 is the most commonly detected in CaCU. The E6 and E7 oncogenes largely explain the oncogenic potential of high-risk HPV. In the regulation of the expression of E6 it's important the viral protein E2 and LCR. Recently, several studies indicate that methylation of CpGs present in the LCR could have a potential role in the regulation of viral gene expression. **Objective:** To evaluate the effect of HPV16 LCR methylation in transcriptional activity of E6 in CaCU. **Material and Methods:** We analyzed the methylation of the LCR 3' fragment of the HPV16 by modification-sequencing, we value the level of E6 mRNA of HPV16 in samples without LEI and CaCU. Besides we analyzed the role of methylation *in vitro* and the methylation by DNMT3B in the transcriptional activity of the HPV16 in C -33A cell line. **Results:** No methylation was found in the fragment of LCR from HPV16 that we analyzed in both samples without LEI and in samples of CaCU. The E6 mRNA level was higher in CaCU than in normal cervical cytology samples. The *in vitro* methylation of the HPV16 LCR and increased levels of DNMT3B gradually decreases transcriptional activity of HPV16. **Conclusions:** The level of E6 mRNA of HPV16 is higher in CaCU than in normal cervical cytology. The *in vitro* methylation of the HPV16 LCR decreased its transcriptional activity in C -33A. Overexpression of DNMT3B1 negatively affects the transcriptional activity of the LCR of VH16.

Keywords: DNA methylation, Long Control Region (LCR), HPV16.

III. INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH) pertenece a un grupo de virus que pueden inducir tumores epiteliales escamosos en diversas localizaciones anatómicas. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer reconoce una fuerte correlación entre el VPH y algunos tipos de cáncer como el cervical, el cáncer de pene, de vulva, de vagina y de ano. En el 2008, de los 12.7 millones de nuevos casos de cáncer que se registraron en todo el mundo, el 4.8% fueron atribuidos a la infección por VPH (Morshed *et al.*, 2014). La infección persistente por VPH de alto riesgo (VPH-AR) es la causa principal de cáncer en diversos sitios del tracto anogenital. El genotipo predominante de VPH-AR en el CaCU es el VPH16, el cual es reportado en 50% del total de los casos de esta malignidad (Chaiwongkot *et al.*, 2013).

El genoma del VPH16 es de DNA circular de doble cadena y tiene ~8000 pares de bases (pb). El genoma se divide en tres regiones: 1) La región larga de control (LCR), 2) región de expresión temprana (EER) y 3) región de expresión tardía (LER). La LCR regula la transcripción del genoma viral y contiene el origen de replicación. La EER codifica para seis marcos de lectura abiertos de E1 a E7 los cuales intervienen en el control de la expresión y replicación viral; la LER codifica dos marcos de lectura abiertos L1 y L2 las cuales son proteínas de la capsida (Vinokurova y Doeberitz, 2011; Hui, 2012; Camilleri y Blundell, 2009; Lazarczyk *et al.*, 2009).

El VPH infecta el epitelio plano escamoso, y su ciclo de replicación está ligado a la diferenciación de los queratinocitos (Kines *et al.*, 2009; Chow *et al.*, 2010). Normalmente las infecciones por VPH-AR son autolimitadas y se revierten espontáneamente en individuos inmunocompetentes, y solo cerca del 25% desarrollan una lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG). Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos o susceptibles, la infección tiene una alta probabilidad de persistir y progresar a lesión intraepitelial escamosa de alto grado (LEIAG) y posteriormente a cáncer cervical invasor (Schmitz *et al.*, 2012).

El VPH-AR se puede encontrar en la célula huésped en forma episomal, en forma integrada o en forma mixta (Woodman *et al.*, 2007). La integración del genoma del VPH generalmente ocurre en regiones del genoma de baja condensación como lo son las regiones transcripcionalmente activas (López y Aristizábal, 2006; Woodman *et al.*, 2007). El proceso de integración implica el rompimiento o linearización del genoma del VPH, evento que principalmente se lleva a cabo la región E1/E2. Durante esta integración, las regiones codificantes de E1 y E2 son generalmente interrumpidas, lo que resulta en la pérdida de su expresión (Moody y Laimins 2010; Saavedra *et al.*, 2012). La proteína E2 es un regulador negativo de la transcripción de los genes E6 y E7. En presencia de la proteína E2 hay represión continua de la transcripción de E6 y E7, por el contrario, la ausencia de la proteína E2 permite el acceso de factores de transcripción celulares los cuales interactúan en distintas regiones de la LCR y permiten la transcripción de los genes E6 y E7 (Lazarczyk *et al.*, 2009; Raybould *et al.*, 2011). E6 y E7 son importantes oncogenes virales, su expresión induce la inmortalización celular y la transformación a través de la interacción con hTERT, p53 y pRB, por lo cual la desregulación de la expresión de E6 y E7 se considera un evento clave en el desarrollo de la carcinogénesis cervical inducida por VPH-AR (Woo y Yang, 2006; Kajitani *et al.*, 2012).

La metilación del DNA es un componente fundamental de la regulación epigenética, la cual es importante en la regulación de la expresión de los genes. La metilación de dinucleótidos CpG puede reducir la actividad transcripcional de un gen al interferir en la unión de factores de transcripción a su secuencia blanco (Feng *et al.*, 2012). Los sitios CpG frecuentemente se encuentran en alta densidad en islas CpG y la mitad de los promotores de los genes humanos tienen en su promotor isla CpG (Baylin, 2005; Lam *et al.*, 2012).

En el genoma del VPH existen sitios CpG que pueden ser metilados (Galván *et al.*, 2011). Este hecho indica que la metilación puede regular la expresión de los genes virales. En este sentido, la metilación de la LCR puede tener efectos importantes en la expresión de todos los genes virales. La LCR contiene sitios de unión para diversos factores de transcripción, dichos sitios tienen CpG, los cuales al ser

metilados podrían interferir con la unión de estos factores y de esta manera afectar la actividad transcripcional del VPH (Hong *et al.*, 2008). La metilación de la LCR del VPH 16 ha sido analizada en varias publicaciones recientes, las cuales muestran que en citología normal la LCR del VPH16 se encuentra totalmente metilada, en lesiones de bajo grado la metilación disminuye y en lesiones de alto grado y CaCU se observa hipometilación de la LCR (De la Cruz-Hernández *et al.*, 2007). Otros datos sobre la metilación del genoma del VPH indican que el patrón de metilación es diferente en infecciones latentes, en lesiones precursoras y en cáncer. Estos cambios en los patrones de metilación parecen estar ligados al proceso de transformación celular inducido por la infección con VPH-AR (Vinokurova *et al.*, 2011). Por otra parte, Ding *et al.*, en el 2009, concluyo que la metilación de la LCR está altamente asociada con la gravedad de la neoplasia cervical, y esto pudiera relacionarse con la disminución de la expresión del oncogen E6. Además, otro hallazgo importante indica que la metilación de los sitios de unión para factores de transcripción en la LCR del VPH16, está relacionado a la etapa de diferenciación epitelial escamosa y podría estar participando de manera importante en la transformación neoplásica (Vinokurova *et al.*, 2011).

Se han realizado varios trabajos para evaluar el estado de metilación del DNA del VPH pero el significado funcional de la metilación en la actividad transcripcional aún no se ha evaluado. Es por eso, que en este trabajo valoramos el efecto que tiene la metilación de la LCR en la actividad transcripcional del VPH16 en la línea celular humana C-33A, en citologías cervicales normales y en CaCU.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea celular humana C-33A (cáncer cervical negativa a VPH) fue obtenida de *American Type Culture Collection (Manassas, VA)*. La línea celular fue cultivada con medio DMEM y F12 1:1 (*Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *PAA Laboratories GmbH, Austria*), 120 U/mL de penicilina (*penprocilin 800,000 U, Lakeside, México*), 150 µg/mL de estreptomina (*Sulfestrep, Pisa Laboratories, México*) y 40 µg/mL de gentamicina (*Schering Plough, México*) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Para los experimentos de transfección, fueron sembradas alrededor de 665,000 células en placas de 12 pozos con 1 mL de medio.

Muestras

Se seleccionaron 10 biopsias de CaCU y 6 muestras de citología cervical normal con VPH16 integrado al genoma celular, del Banco de DNA del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

Construcciones y plásmidos

La LCR del VPH16 fue clonada en el vector reportero pGL3-Basic (*Invitrogen*) utilizando el kit *In-Fusion HD Cloning (Clontech Laboratories, Inc)*. Los iniciadores utilizados para amplificar la LCR completa fueron los siguientes: sentido 5' TTT CTC TAT CGA TAG AGA CCT AGA TCA GTT TCC TT y reverso 5' CTT AGA TCG CAG ATC CTC CTG TGG GTC CTG AAA. El vector reportero pGL3-Basic fue digerido con las enzima de restricción *BglII* y *KpnI* (*Fermentas, Glen Burnie, MD, USA*). Las construcciones fueron verificadas por secuenciación automatizada antes de ser usadas en las transfecciones.

Metilación *in vitro*

La metilación *in vitro* de todos los vectores reporteros fue realizada con la metiltransferasa bacteriana M.SssI, utilizando 0.8 U/µg (*New England Biolabs*) y 200

μM de SAM (*New England Biolabs*) a 37°C durante 44 minutos para la metilación total y 3 minutos para la metilación parcial. Posteriormente la enzima M.SssI fue inactivada a 65°C durante 20 min. El análisis de la metilación de los vectores reporteros se realizó por restricción con 0.8 U/ μg de las enzimas *HpaII* y *MspI* (*Fermentas*) a 37°C durante 4 horas y los fragmentos digeridos fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5%.

Transfecciones

Células C-33A fueron transitoriamente transfectadas por el método de lipofectamina con 1 μg de cada uno de los vectores reporteros metilados y no metilados; 24 horas después de la transfección las células fueron cosechadas y procesadas para el análisis de la actividad transcripcional valorando la actividad de la luciferasa.

Ensayo de luciferasa:

Los ensayos de luciferasa se realizaron con el kit *Luciferase assay system* (*Promega, Madison, WI*). Los lisados proteicos se obtuvieron de la siguiente manera; las células se cosecharon con PBS frío, posteriormente se realizaron dos ciclos de congelación descongelación y se resuspendieron en 100 μl de buffer reportero de lisis. Luego cantidades iguales de lisado proteico ~70 μg se incubaron con reactivo de ensayo de luciferasa. La detección de la luz se hizo mediante el uso de *Fluoro Skan Ascent FL 374* (*Thermo Electron, Waltham, MA*). El vector pGL-3-control (*Invitrogen*) se usó como un control interno para el monitoreo de la eficiencia de la transfección.

Modificación con bisulfito de sodio y amplificación del segmento 3' de la LCR del VPH 16.

Se utilizó un 1 μg de DNA genómico para realizar la modificación con bisulfito de sodio mediante el uso del kit *EZ DNA Methylation Gold Kit* (*Zymo Research*). Los iniciadores para amplificar de la LCR fueron reportados previamente (Kalantari *et. al.*, 2004). Para amplificar el segmento 3' (o promotor) de la LCR se utilizaron los

iniciadores 16msp5F (posiciones 7750 a 7779; TAA GGT TTA AAT TTT AAG GTT AAT TAA AT y 16msp8R (posiciones 86 a 115; ATC CTA AAA CAT TAC AAT TCT CTT TTA ATA obteniéndose un producto de 272 pb. Se utilizaron de 200 a 500 ng de DNA modificado con bisulfito para cada PCR, 0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada oligo, buffer de PCR 1X, y 2.5 Unidades de *AmpliTaq Gold* DNA Polymerase en un volumen final de 25 µl. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2%.

Clonación y selección de clonas

Los productos de PCR se clonaron utilizando el kit *ClonJET PCR cloning* (*Thermo scientific*) cual contiene el vector pJET1.2/blunt. Posterior a la transformación se seleccionaron colonias de forma aleatoria para la identificación del producto clonado por PCR de colonia. Dicha PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL que contiene 0.2 mM de dNTPs, 10 pmol de los iniciadores M13F/R, 1 mM de MgCl₂ y 1 U de polimerasa *Promega*. La PCR se inició a 94°C por 7 minutos, seguida por una amplificación de 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 60°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 1 minuto) con una extensión final a 72°C por 7 min. Se verificó la presencia de producto por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez comprobado que se obtuvo un producto de PCR de acuerdo al peso esperado se escogieron solo 5 clonas para la extracción de DNA plasmídico y su posterior purificación usando *SAP* (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) y *Exol* (*Exonuclease I*) de la compañía USB. En un tubo se agregó 9.5 µL del producto de PCR de colonia, 1 µL del buffer 10X *SAP*, 1 µL de *SAP* y 0.5 µL de *Exol*. La mezcla de reacción se incubó por 1 hora a 37° C, posteriormente se inactivó la enzima a 72° C por 30 minutos y enseguida se guardó el producto de PCR purificado a 4° C.

Marcaje y purificación

El marcaje para la secuenciación se hizo bajo las siguientes condiciones de ciclaje; 95° 5 min; 95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 2 min por 30 ciclos; 72°C 7 min, utilizando los mismos iniciadores, el producto de marcaje se purificó mediante la técnica con isopropanol al 85%, posteriormente se realizó la secuenciación mediante el método

fluorescente de secuenciación en ciclo (*Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Kit, Applied Biosystems*) en un secuenciador automático de DNA ABI Prism 310 *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* (Casas, *et al.*, 1999). Las citosinas metiladas fueron identificadas a través de alineamientos realizados con los programas methprimer y LALIGN.

RT-qPCR:

El RNA total fue extraído por el método del TriZol (*Invitrogen*). El cDNA y la PCR se realizaron en una reacción de un solo paso con el kit *KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kits*. Los iniciadores para valorar el nivel de expresión de E6 fueron los siguientes: 5' GCA CCA AAA GAG AAC TGC AAT GTT y 5' AGT CAT ATA CCT CAC GTC GCA GTA. Como control de expresión endógena se midió la expresión de GADPH. Los ensayos fueron realizados 2 veces por duplicado en el equipo *Step-One plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)*.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como los valores de la media \pm el error estándar (E.E). La evaluación estadística de las diferencias significativas fue realizada utilizando la prueba de *t* de Student. Las diferencias de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

V. RESULTADOS

Metilación de la LCR del VPH16

Para valorar el efecto de la metilación de la LCR en la actividad transcripcional del VPH16, primero decidimos analizar la metilación del fragmento 3' o promotor de la LCR, mediante modificación con bisulfito de sodio-secuenciación. Analizamos muestras sin LEI y CaCU. La región analizada del genoma del VPH16 incluyó de la base 7750 a 150, dicha región contiene seis dinucleótidos CpG (Figura 1). Al analizar 3 clonas seleccionadas para secuenciación, no detectamos metilación en ninguno de los CpGs analizados tanto en muestras de citología cervical normal como en las de CaCU.

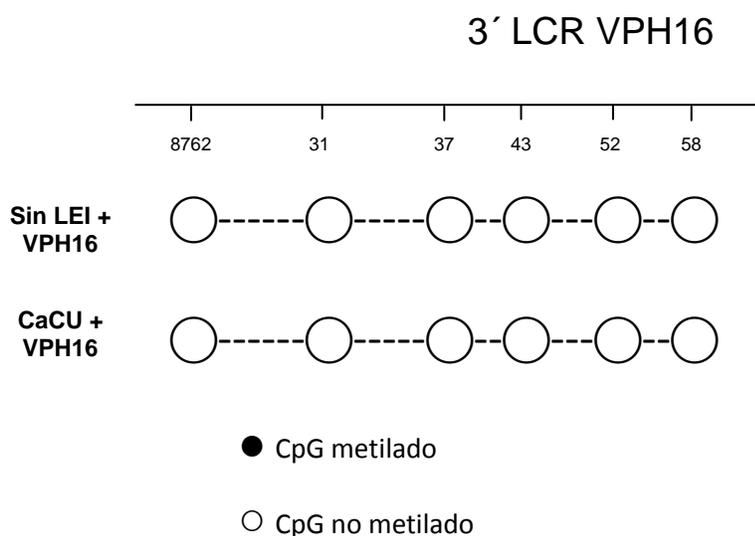


Figura1. Perfil de metilación del segmento 3' de la LCR del VPH16 en muestras sin LEI y CaCU.

El estado de metilación fue determinado por modificación con bisulfito de sodio seguido por secuenciación de 3 clonas. Cada uno de los círculos representa uno de los 6 CpG, y el número en la parte superior representa la posición de este CpG en el genoma del VPH16. Los círculos en blanco representan un CpG no metilado, círculos negros representan CpG metilado.

Nivel de RNAm de E6 VPH16 en muestras sin LEI y CaCU.

El nivel de RNAm de E6 se determinó mediante RT-qPCR en diez muestras de CaCU y en seis muestras sin LEI, todas con infección por VPH16. En donde encontramos que el 70% (7/10) de las muestras de cáncer cervical mostraron una expresión elevada de E6 (un incremento mayor del doble), en comparación con las muestras sin LEI (Figura 2). La media del nivel de RNAm para las muestras de cáncer fue significativamente mayor (99.23) que en las muestras sin LEI (3.59) ($p=0.0313$, t -test). Aunque solo valoramos el nivel de expresión de E6 en muestras sin LEI y CaCU, estos datos nos sugieren que el nivel de expresión aumenta con el desarrollo de la enfermedad.

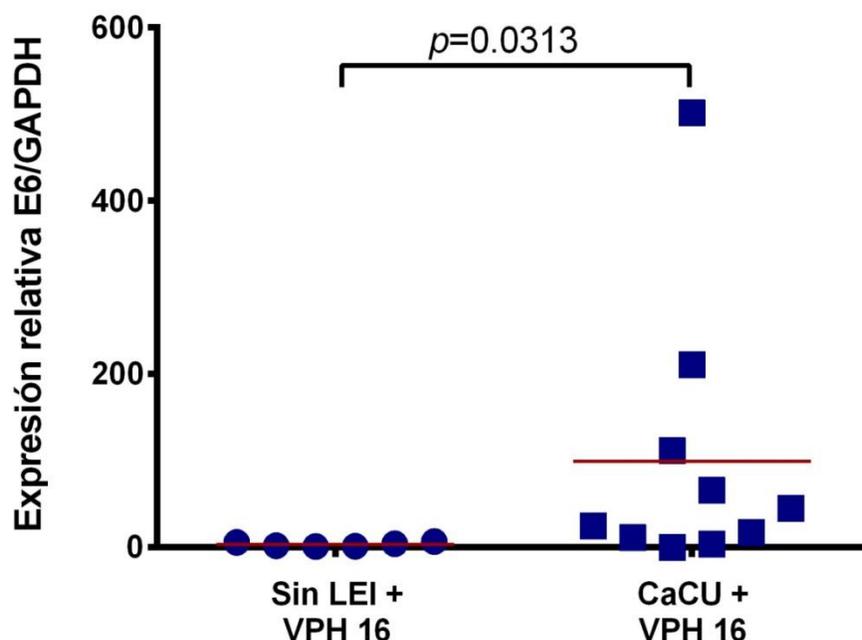


Figura 2. Expresión relativa del RNAm de E6 en tejido cervical normal y cáncer cervical. El nivel de expresión se determinó por RT-qPCR, los datos fueron normalizados respecto a GAPDH (método comparativo C_T). Los resultados son expresados como la media (línea roja) \pm error estándar. Se realizaron dos experimentos de manera independiente por duplicado.

Efecto de la metilación de la LCR del VPH16 en la actividad transcripcional en la línea celular C-33A.

Para valorar el efecto de la metilación de la LCR del VPH 16 en la actividad transcripcional, nosotros realizamos la construcción pKLCRB16-Luc. A partir del vector reportero pGL3-Basic, en el cual clonamos 1021 pb de la LCR del VPH16 (nucleótidos 7008 a 124, secuencia de referencia: NC_001526). La figura 3 muestra el mapa de la construcción pKLCRB16-Luc. La construcción fue verificada por secuenciación.

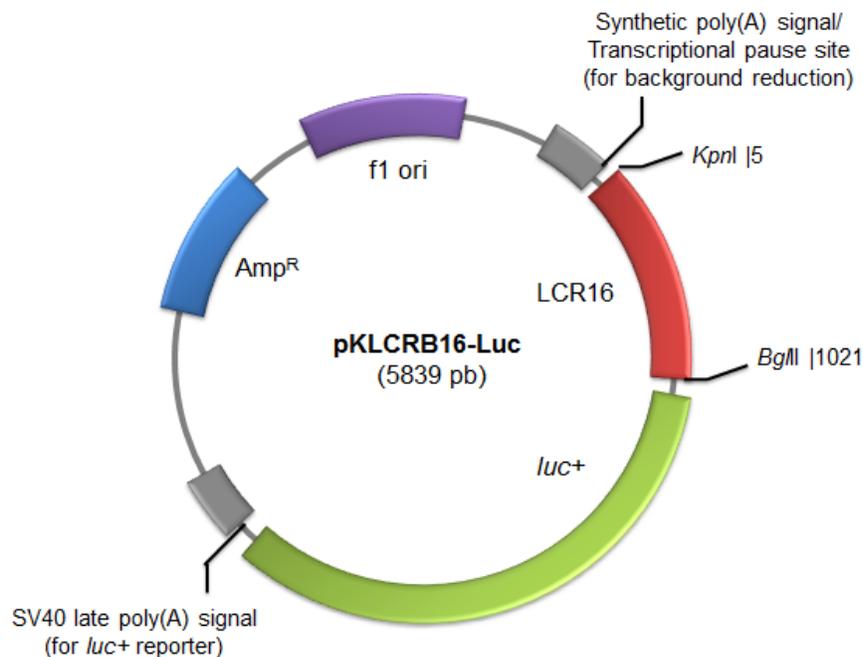


Figura 3. Mapa de la construcción pKLCRB16-Luc. En donde podemos observar: LCR16, Región larga de control del VPH16; la cual está flanqueada por sitios de corte para las enzimas *KpnI* y *BglII*. Región *Luc+*, que corresponde al cDNA que codifica a luciferasa de luciérnaga modificada. Región *Amp^R*, gen que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*. Ori f1, origen de la replicación derivada del fago filamentoso. Ori, origen de la replicación en *E. coli*.

Una vez obtenida la construcción pKLCRB16-Luc, fue producida en cantidades suficientes y purificada con el kit de alta pureza *GeneJET Plasmid Midiprep Kit* para posteriormente realizar los experimentos de transfección en la línea celular C-33A.

Para valorar el efecto directo de la metilación de la LCR del VPH16 en la actividad transcripcional, metilamos *in vitro* total y parcialmente la construcción pKLCRB16-

Luc, durante 45 y 3 minutos, respectivamente. Posterior a la metilación, realizamos los experimentos de transfección en C-33A utilizando como control la misma construcción pKLCRB16-Luc sin metilar (No metilado). Como se observa en la figura 4, la metilación *in vitro* total y parcial de la LCR del VPH16 disminuye significativamente su actividad transcripcional. Estos resultados sugieren que la metilación de la LCR podría modular la expresión del oncogen E6 del VPH16.

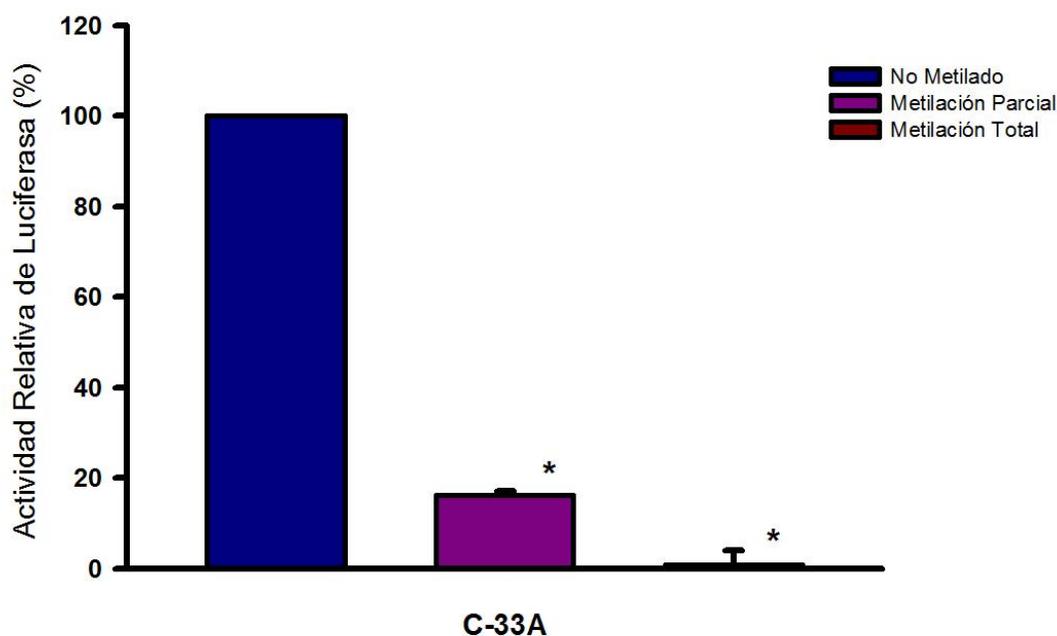


Figura 4. Efecto de la metilación *in vitro* de la LCR del VPH16 en la actividad transcripcional en C-33A. Las células fueron cosechadas 24 hrs después de la transfección para los ensayos de luciferasa. Las barras representan la media de tres experimentos independientes por triplicado y se indica el error estándar. (* $p = <0.05$, *t*-test).

La metilación del DNA es llevada a cabo por DNA metiltransferasas, principalmente por DNMT1 y DNMT3B, esta última está relacionada con la metilación anormal en distintos tipos de cáncer humano. Entonces, para valorar la contribución de DNMT3B en la actividad transcripcional del VPH16, realizamos experimentos de co-transfección en C-33A. Para lo cual aumentamos el nivel de expresión de DNMT3B mediante un vector de expresión que contiene el cDNA de DNMT3B1 y valoramos su efecto en la actividad transcripcional del VPH16. Como podemos ver en la figura 5, el

aumento gradual en los niveles de DNMT3B disminuye gradualmente la actividad transcripcional de la LCR VPH16 en la línea celular C-33A. Estos resultados sugieren que DNMT3B es capaz de metilar la LCR del VPH16 y esto provoca la disminución en su actividad transcripcional.

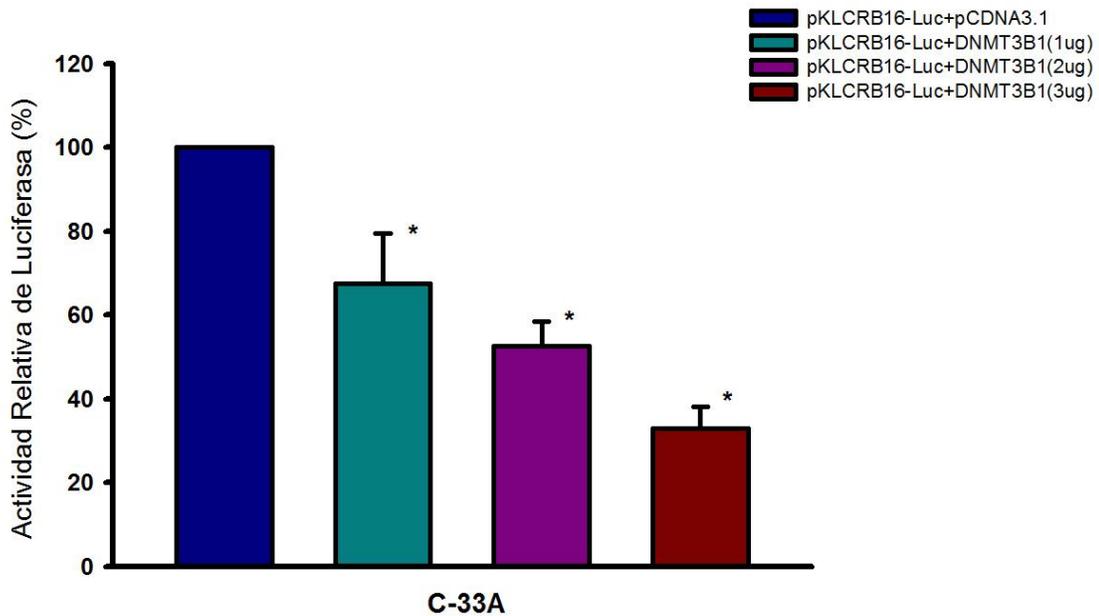


Figura 5. Efecto de la co-transfección de DNMT3B1 sobre la actividad transcripcional del vector reportero pKLCRB16-Luc en C-33A. Las células fueron cosechadas 24 hrs después de la co-transfección para los ensayos de luciferasa. Las barras representan la media de tres experimentos independientes por triplicado y se indica el error estándar. (* $p = <0.05$, t -test).

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en México y en el resto del mundo. Particularmente, el CaCU es la primera causa de muertes por cáncer en mujeres mexicanas. El desarrollo de este carcinoma está íntimamente relacionado con la infección con VPH-AR, principalmente debido a la capacidad oncogénica de las proteínas virales E6 y E7. Sin embargo, otras alteraciones genéticas y epigenéticas son necesarias para la progresión de la lesión precancerosa a cáncer invasor. Entre los cambios más tempranos y comunes en el proceso de carcinogénesis se encuentra la metilación del DNA (Badal *et. al.*, 2003; Patel *et. al.*, 2012). Varios estudios han sugerido que la metilación del DNA viral puede estar asociada con la expresión génica viral y la progresión del cáncer. Se han observado diferentes patrones a nivel de metilación tanto en el genoma del huésped como en el genoma viral, los cuales podrían estar involucrados en el control de la transcripción de las proteínas virales. Por lo tanto, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el patrón de metilación del fragmento 3' de la LCR del VPH 16, para relacionarlo con el nivel de expresión de E6. Los resultados que encontramos en cuanto a la metilación del fragmento 3' de la LCR no fueron los esperados ya que no encontramos diferencias en la metilación de la LCR entre las muestras sin LEI y las muestras de CaCU. Los resultados para las muestras de CaCU coinciden con los resultados obtenidos por Vinokurova y colaboradores en el 2011, donde analizan la metilación de la LCR del VPH16, sin encontrar metilación en el extremo 3'. Sin embargo, en las muestras de citología cervical normal, donde analizan la metilación de este fragmento en una misma muestra varias veces (hasta 10 clonas) los resultados varían desde no metilado hasta totalmente metilado. En este estudio solo realizamos tres repeticiones por muestra, por lo tanto es necesario realizar un mayor número de repeticiones y analizar otros fragmentos de la LCR del VPH16.

Otro de los objetivos de este trabajo fue determinar el nivel de expresión de E6 en muestras de citología normal y en biopsias de CaCU con infección por VPH16. En nuestros resultados encontramos altos niveles de expresión en las muestras de CaCU (más del doble), en comparación con las muestras sin LEI. Nuestros

resultados fueron similares a los obtenidos por Mazumder y col. en el 2011, en donde evaluaron la expresión de la oncoproteína viral E6 en 36 muestras de tumores cervicales, encontrando una sobre-expresión de E6 en todas las muestras analizadas. Estos datos nos sugieren que altos niveles de expresión de E6 podrían ser importantes para la transformación y progresión del cáncer (Ding *et. al.*, 2009).

El mecanismo por el cual los VPH-AR favorecen el desarrollo de la neoplasia cervical, se explica principalmente por la acción de dos de sus oncoproteínas virales, E6 y E7. Estas tienen la capacidad de promover la inmortalización y transformación de los queratinocitos, confiriéndoles un alto grado de inestabilidad genética (Klymenko y Graham, 2012). Algunos estudios respecto al mecanismo molecular del proceso de transformación, han revelado un complejo patrón de interacciones de estas proteínas virales con reguladores celulares, envueltos en procesos biológicos como: apoptosis, proliferación y la diferenciación celular (Morshed *et. al.*, 2014). Por ejemplo: la oncoproteína E6, es capaz de promover la inmortalización celular por medio de la inducción de la transcripción y activación de la subunidad catalítica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT), por un mecanismo que no ha sido completamente dilucidado (Camilleri y Blundell, 2009; Kajitani *et. al.*, 2012). Por otro lado, E6 también puede unirse a p53, lo cual conduce a su degradación a través de la vía de la ubiquitinación, proceso en que participa la proteína celular asociada a E6 (E6-AP), la cual actúa como una ubiquitin ligasa de p53 (Schwartz, 2013). Así también E6, ha sido implicada en la prevención de la apoptosis a través de mecanismos dependientes e independientes de p53 (Raybould *et. al.*, 2011; Faridi *et. al.*, 2011).

Para conocer a fondo la causa de los altos niveles de expresión de E6, se hace necesaria la valoración de los reguladores de expresión génica de este oncogén, hablando particularmente de reguladores epigenéticos, nosotros valoramos el efecto que la metilación del DNA puede tener sobre los niveles de expresión de E6, motivo por el cual se generó la construcción pKLCRB16-Luc, construcción que posee la secuencia completa de la LCR del VPH16 (promotor del oncogen E6). Con la que al evaluar la actividad transcripcional (como actividad relativa de luciferasa) de la LCR con diferentes grados de metilación (sin metilar, parcialmente metilada y totalmente

metilada) encontramos una disminución importante y significativa y proporcional en la actividad transcripcional con respecto del grado de metilación. Es decir, a mayor metilación existe una menor actividad transcripcional, lo cual sugiere que la metilación de la LCR podría regular la expresión del oncogen E6 en el VPH16.

Muchos estudios basados en genes celulares indican que la ausencia de la metilación del DNA de un promotor permite la plena expresión de un gen, mientras que su presencia se correlaciona con el silenciamiento génico (Esteller, 2011; Mazumder *et. al.*, 2011). Esto se debe a que los grupos metilo, impiden el acceso de factores de transcripción a sus sitios de unión, además de que los dinucleótidos CpG metilados interactúan con proteínas de unión a DNA metilado, las cuales reclutan desacetilasas de histonas (Routre *et. al.*, 2001). Por lo consiguiente, la desacetilación de histonas conduce a cambios en la configuración de la cromatina, hecho que impide eficazmente la unión de factores necesarios para la transcripción. (Zheng y Baker, 2006; Rodenhiser y Mann 2006; Bransma *et. al.*, 2010).

Para evaluar el efecto que tiene la metilación sobre la actividad transcripcional de una manera más apegada a condiciones naturales, evaluamos el efecto de la metilación en la actividad transcripcional mediante un vector de expresión de DNMT3B1. Para lo cual se co-transfectó la construcción pKLCRB16-Luc no metilada con concentraciones crecientes de DNMT3B1 (metiltransferasa de DNA, metila de *novo*). Nuestros resultados mostraron que al aumentar los niveles de concentración de DNMTB1 y por lo tanto el grado de metilación del DNA, se obtuvo una disminución en la actividad transcripcional, significativa y dependiente de la concentración a con respecto del control. En conclusión, nuestros experimentos sugieren que los patrones de metilación del DNA de la LCR del VPH16 pueden ser reguladores importantes de la transcripción génica viral, por lo que la metilación puede ser un mecanismo importante en el desarrollo y progresión del cáncer cervical.

VII. REFERENCIAS

1. Badal V., Chuang L. H. S., Tan E. H., Badal S., Villa L. L., Wheeler M. C., Li F. L. B., B., Bernard H-U., (2003), CpG Methylation of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Cancer Cell Lines and in Clinical Specimens: Genomic Hypomethylation Correlates with Carcinogenic Progression, *American Society for Microbiology*, 77 (11): 6227- 6234.
2. Baylin B. S., (2005), DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nature Clinical Practice Oncology* 2:S4-S11 doi:10.1038/ncponc0354
3. Brandsma L. J., Sun Y., Lizardi M. P., Tuck P. D., Zelterman D., Haines K. G., Martel M., Harigopal M., Schofield K., Neapolitano M., (2010), Distinct Human Papillomavirus Type 16 Methylomes in Cervical Cells at Different Stages of Premalignancy, *Nathional Institute of Healts*, 389(1-2): 100–107.
4. Camilleri G. y Blundell R., (2009), The Human Papillomaviruses (HPVs) and HPV DNA Testing, *Research Journal of Biological Sciences*, 4(1):29-36.
5. Chaiwongkot A., Svetlana Vinokurova S., Pientong C., Ekalaksananan T., Kongyingyoes B., Kleebkaow P., Chumworathayi B., Patarapadungkit N., Reuschenbach M. and Doeberitz M., (2013), Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions, *International Journal of Cáncer*, 132, 2087–2094.
6. Chow L. T., Broker R. T., y Steinberg M. B., (2010), The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia, *Journal Compilation*, 118: 422–449,
7. De la Cruz-Hernandez E., Adriana Contreras-Paredes A., Mohar A., Cantú D., Lizano M., Duenas-Gonzalez A., (2007), The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors upon the human papillomavirus early genes expression in cervical cancer. An in vitro and clinical study, *BMC Cancer*, 7(Suppl 1):A25.
8. Ding D. C., Chiang M. H., Lai H. C., Hsiung A. C., Hsieh C. Y., Chu T. Y., (2009), Methylation of the long control region of HPV16 is related to the severity of cervical neoplasia, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 147: 215-220.
9. Esteller M., (2011), Epigenetic changes in cáncer, *F1000 Biology Reports*, 3:9.
10. Faridi R., Zahra A., Khan K. and Idrees M., (2011), Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cáncer, *Virology Journal* 2011, 8:269.
11. Feng W., Dong Z., He B., Wang K., (2012), Analysis method of epigenetic DNA methylation to dynamically investigate the functional activity of transcription factors in gene expression, *BMC Genomics*, 13:532. doi:10.1186/1471-2164-13-532

12. Galván S., Martínez-Salazar M., Galván V., Méndez R., Díaz-Contreras G., Alvarado-Hermida M., Alcántara-Silva R. and García-Carrancá A., (2011), Analysis of CpG methylation sites and CGI among human papillomavirus DNA genomes, *BMC Genomics*, 12:580.
13. Hong D., Ye F., Lu W., Hu Y., Wan X., Che Y., Xie X., (2008), methylation status of the long control region of hpv 16 in clinical cervical specimens, *molecular medicine reports* 1: 555-560.
14. Hui J. Y., (2012), Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis, *Chinese Journal of Cancer*, doi:10.5732/cjc.012.10033
15. Kajitani N., Satsuka A., y Sakai H., (2012), Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation, *Frontiers in Microbiology*, 3: 1-12.
16. Kines C. R., Thompson D. C, Lowy R. D., Schiller T. J., Day M. P.,(2009),The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding, *PNAS*, 106 (48): 20458–20463.
17. Klymenko T., y Graham V. S., (2012), Human papillomavirus gene expression is controlled by host cell splicing factors, *Biochemical Society Transactions*, 40:773–777. doi:10.1042/BST20120079
18. Lam L. L., Emberly E., Fraser B. H., Neumann M. S., Chen E., E. Miller E. G., Michael S. Kobor S. M., (2012), Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort, *PNAS*, 1-8.
19. Lazarczyk M., Cassonnet P., Pons C., Jacob Y., and Favre M., (2009), The EVER proteins as a Natural Barrier against Papillomaviruses: a New Insight into the Pathogenesis of Human Papillomavirus Infections. *73(2)*: 348–370.
20. López J. y Aristizábal F. A., (2006), Integración viral y cáncer de cuello uterino, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 35 (1):5-32.
21. Mazumder D., Singh R., Mitra S., Dutta S., Chakraborty C., Basu P., Mondal R., Roychoudhury S., and Panda C., (2011), Genetic and epigenetic changes of HPV16 in cervical cancer differentially regulate E6/E7 expression and associate with disease progression, *Gynecologic Oncology*, 123: 597–604.
22. Méndez S. R., Miguez P. C., Guido C. M., García-Carrancá A., (2007), Analysis of the methylation status of HPV DNA in human cell lines, *BMC Cancer*, 7(Suppl 1):A26.
23. Moody A. C., y Laimins A. L., (2010), Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation, *Nature Reviews Cancer*, 10: 550-560.
24. Morshed K., Polz-Gruszka D., Szymański M., and Polz-Dacewicz M., (2014), Human Papillomavirus (HPV) – Structure, epidemiology and pathogenesis, *otolaryngologia polska*, 68: 213 – 219.

25. Patel A. D., Rozek S. L., Colacino A. J., Zomeren-Dohm V. A., Ruffin T. M., Unger R. E., *et al.*, (2012), Patterns of cellular and HPV 16 methylation as biomarkers for cervical neoplasia, *Journal of Virological Methods* 184: 84– 92.
26. Raybould R., Fiander A., Hibbitts S., Human Papillomavirus Integration and its Role in Cervical Malignant Progression (2011), *The Open Clinical Cancer Journal*, 5: 1-7.
27. Rodenhiser D., Mann M., (2006), Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications, *CMAJ*, 174(3): 341.348.
28. Routree R. M., Bachman E. K., Herman G. J., Baylin B. S., (2001), DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer, *The Johns Hopkins Oncology Center*, 20(24): 3156-3165.
29. Saavedra P. K., Brebi M. P., Rosa S. J. C. (2012), Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix, *Clinical Epigenetics*, 4:13.
30. Schmitz M., Driesch C., Jansen L., Runnebaum B. I., Durst M., (2012), Non-Random Integration of the HPV Genome in Cervical Cancer, *Plos One*, 7(6): e39632.
31. Schwartz S., (2013), Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation, *Virology* 445:187–196.
32. Vinokurova S., Doeberitz M., (2011), Differential Methylation of the HPV 16 Upstream Regulatory Region during Epithelial Differentiation and Neoplastic Transformation, *Plos One*, 6(9): e24451.
33. Woo S. y Yang J. S., (2006), Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein as a Therapeutic Target, *Yonsei Medical Journal*, 47 (1): 1-14.
34. Woodman J. B. C., Stuart I. Collins I. S., Young S. L., (2007), The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues, *Nature Reviews Cancer*, 7:11-22.
35. Zeng Z. M., y Baker C. C., (2006), Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation, *National Institute of Health*, 11: 2286–2302.