



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



**EFFECTO DE HOTAIR EN LA METILACIÓN GLOBAL
DEL DNA EN LA LÍNEA CELULAR HeLa**

T E S I S

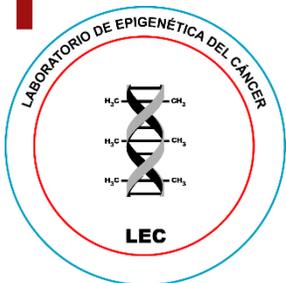
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

QBP. EDUARDO BLANCO OLAIS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO



Chilpancingo, Gro. Enero, 2019



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

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de enero de dos mil diecinueve 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 HOTAIR en la metilación global del DNA en la línea celular HeLa", presentada por el alumno Eduardo Blanco Olais, 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

Dr. Daniel Hernández Sotelo
Dirección de tesis

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Vo. Bo

Dr. Daniel Hernández Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias
Biomédicas

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas



UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021



UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021

El desarrollo de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Epigenética del Cáncer.

Bajo la dirección de:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Bajo la asesoría de:

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Oscar del Moral Hernández

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Durante el periodo en que curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Eduardo Blanco Olais, recibió beca del CONACYT.

EFEECTO DE HOTAIR EN LA METILACIÓN GLOBAL DEL DNA EN LA LÍNEA CELULAR HeLa

ÍNDICE

II. RESUMEN.....	6
III. ABSTRACT.....	7
IV. INTRODUCCIÓN.....	8
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
VI. RESULTADOS.....	14
VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	26
VIII. REFERENCIAS.....	32

I. RESUMEN

Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) participan en el origen y desarrollo de diferentes enfermedades, por ejemplo, cáncer. HOTAIR es un lncRNA implicado con muchos tipos de cáncer, incluyendo cáncer cervical, en este tipo de cáncer se ha observado que HOTAIR participa en invasión, migración y metástasis. Por otro lado, en cancer cervical se han reportado patrones aberrantes de metilación en el DNA pero se desconoce quién modula estos patrones de metilación. Recientes reportes indican que HOTAIR está implicado en la modulación de la metilación de algunos genes en diferentes tipos de cáncer, pero esto se desconoce en cancer cervical. En este estudio se analizó el efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de DNMTs y la metilación del DNA a escala global en células HeLa. La expresión de las DNMTs fue analizada por RT-qPCR y la metilación global mediante el arreglo Infinium MethylationEPIC BeadChip. Encontramos que la disminución de HOTAIR afecto la expresión de DNMT1 y DNMT3A. También observamos que HOTAIR afecto la metilación de 795 sitios CpGs, principalmente en el cuerpo de los genes y en regiones intergénicas. Estos genes con metilación diferencial están involucrados en vías importantes para el cáncer, como: moléculas de adhesión celular (CAMs), endocitosis, funciones adherentes, vía de señalización WNT y vía de señalización jak-STAT, etc. Sugiriendo que HOTAIR puede llevar acabo su efecto oncogénico a través de estos genes. En conclusión, estos resultados muestran que HOTAIR afecta la metilación de diferentes genes involucrados en la migración e invasión celular, por lo que, el efecto de HOTAIR en el desarrollo tumoral puede ser llevado a cabo vía metilación.

Palabras clave: HOTAIR, DNMT1, DNMT3A, HeLa, metilación.

II. ABSTRACT

Long non-coding RNAs (lncRNAs) participate in the origin and development of different diseases, for example, cancer. HOTAIR is an lncRNA involved with many types of cancer, including cervical cancer, in this type of cancer it has been observed that HOTAIR participates in invasion, migration and metastasis. On the other hand, aberrant DNA methylation patterns have been reported in cervical cancer, but it is unknown who modulates these methylation patterns. Recent reports indicate that HOTAIR is involved in the modulation of the methylation of some genes in different types of cancer, but this is unknown in cervical cancer. In this study, the effect of the decrease of HOTAIR on the expression of DNMTs and DNA methylation on a global scale in HeLa cells was analyzed. The expression of the DNMTs was analyzed by RT-qPCR and the global methylation using the Infinium MethylationEPIC BeadChip array. We found that the decrease in HOTAIR affected the expression of DNMT1 and DNMT3A. We also observed that HOTAIR affected the methylation of 795 CpG sites, mainly in the body of genes and in intergenic regions. These genes with differential methylation are involved in important pathways for cancer, such as cell adhesion molecules (CAMs), endocytosis, adherent functions, WNT signaling pathway and jak-STAT signaling pathway, etc. Suggesting that HOTAIR can carry out its oncogenic effect through these genes. In conclusion, these results show that HOTAIR affects the methylation of different genes involved in cell migration and invasion, therefore, the effect of HOTAIR on tumor development can be carried out via methylation.

Keywords: HOTAIR, DNMT1, DNMT3A, HeLa, methylation.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades que afectan el crecimiento celular volviéndolo anormal y con el potencial de invadir y propagarse a otras partes del cuerpo (Hehenberger, 2015). Varios estudios han encontrado alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas y requeridas para el inicio, desarrollo y progresión de muchos tipos de cáncer. La maquinaria de la regulación epigenética que participa, principalmente, en el desarrollo de cáncer son la metilación del DNA, modificaciones de histonas, posicionamiento nucleosomal y regulación por RNAs no codificantes (ncRNAs) (Beckedorff *et al.*, 2013).

Actualmente, los análisis de transcripción a escala global indican que gran parte del genoma es dinámicamente transcrito en lncRNAs (Carninci *et al.*, 2005). Estas observaciones son fundamentadas por el incremento en el número de estudios funcionales que muestran que los lncRNAs tienen papeles regulatorios en cada estado de expresión génica, desde modificaciones epigenéticas en el núcleo, hasta la modulación de RNAm en el citoplasma (Carrieri *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2011). Como resultado de estos estudios los lncRNAs han sido ampliamente estudiados y han surgido como una nueva clase de genes. Los lncRNAs son una clase de transcritos de más de 200 nucleótidos sin potencial codificante para proteína (Ponting *et al.*, 2009), sin embargo, aunque no se traducen a proteína, tienen un papel clave en la remodelación de la cromatina, regulación de la expresión, crecimiento, diferenciación y desarrollo celular (Gibb *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012). Se ha reportado que los lncRNAs se encuentran alterados en diferentes enfermedades, principalmente en cáncer (Shi *et al.*, 2013).

HOTAIR (*Hox transcript antisense intergenic RNA*) es un RNA largo no codificante intergénico (lincRNA) el cual puede regular de manera epigenética los estados de la cromatina (Tsai *et al.*, 2010). HOTAIR se encuentra sobre-expresado en distintos tipos de cáncer incluyendo el cáncer cervical. En este tipo de cáncer se ha reportado que la alta expresión de HOTAIR se asocia significativamente con metástasis linfática y con la profundidad de la invasión cervical (Huang *et al.*, 2014). HOTAIR también afecta la expresión de VEGF, MMP-9 y de genes relacionados con transición epitelio

mesénquima (TEM) que son vitales para la migración celular y metástasis en cáncer cervical (Kim *et al.*, 2014). Recientemente un meta-análisis reportó una asociación entre los altos niveles de HOTAIR con menor supervivencia de pacientes con cáncer cervical (Cui *et al.*, 2017), sin embargo, se desconocen gran parte de los genes que son afectados para que HOTAIR pueda llevar a cabo estos procesos y sea de vital importancia en cáncer cervical. Por otro lado, uno de los mecanismos epigenéticos más importantes y el mejor estudiado en cáncer es la metilación del DNA. La metilación del DNA es la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de las citosinas, generalmente ocurre en citosinas adyacentes a guaninas localizadas en regiones llamadas islas CpGs dentro de los promotores de los genes (Kanwal *et al.*, 2015), sin embargo también se ha encontrado metilación en otras regiones fuera de islas CpGs que pueden tener una implicación importante para la regulación transcripcional de genes, como en islas shore (región a 2kb de una isla CpG), islas shelf (región a 4 kb de una isla CpG), e incluso en regiones fuera de estas islas (opensea). La metilación en los promotores de los genes se ha asociado con regulación transcripcional (De Carvalho *et al.*, 2012), sin embargo, también se ha observado metilación en otras regiones como en el cuerpo del gen, primer exón, región UTR, enhancer, entre otras, y que son importantes en la regulación transcripcional (Rondelet y Wouters, 2017). En cáncer cervical la metilación afecta principalmente genes involucrados en apoptosis, proliferación celular, ciclo celular, reparación de DNA, crecimiento celular, adhesión, invasión, metástasis, entre otros procesos (Bhat *et al.*, 2016).

A pesar de la importancia de la metilación del DNA en cáncer cervical, actualmente se desconoce cómo es que la metilación ocurre en regiones específicas, principalmente en genes involucrados en los procesos antes mencionados (Schübeler, 2015). En este sentido ha surgido evidencia de que los lncRNAs pueden afectar la metilación de sus genes blanco para regular su expresión, y actualmente hay reportes que demuestran que HOTAIR afecta la metilación de los genes PTEN, PCDH10, HOXA1 y WIF1 en diferentes tipos de cáncer (Li *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2017), sin embargo, no hay reportes de cuáles son los genes blanco de HOTAIR vía metilación en cáncer cervical.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular de cáncer cervical HeLa (adenocarcinoma cervical) se cultivó en medio DMEM/Ham's F-12 1:1 (CAISSON Laboratories, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino, y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco-BRL, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las células se mantuvieron a 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂.

Transfecciones

Alrededor de 50,000 células fueron sembradas en placas multipozos de 12 y se mantuvieron en 1 mL de medio suplementado a 37°C y a 5% de CO₂ toda la noche antes de la transfección. Al siguiente día las células se transfectaron con 0.02 nMol/uL del interferente para HOTAIR utilizando Lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen, Life Technologies). La secuencia del interferente específico para HOTAIR: DsiRNA-F 5' UAA CAA GAC CAG AGA GCU GUU y DsiRNA-R 5' CCA CAU GAA CGC CCA GAG AUU. Como DsiRNA control: (NC) 5' CUA CAA CAG CCA CAA CGU CdTdT. Todos los demás experimentos se realizaron 48 horas post-transfección.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó utilizando TRIzol (Invitrogen, California, EEUU). Se agregaron 400 µL de TRIzol, 80 µL de cloroformo, 200 µL de etanol absoluto, 200 µL de etanol al 70% y finalmente el RNA se re-suspendió en 20 µL de agua DEPC. La cuantificación del RNA se realizó por espectrofotometría mediante el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Tratamiento oxidativo y modificación con bisulfito de sodio

La extracción de DNA se realizó con el kit Wizar Genomic DNA Purification (Promega, USA). La modificación del DNA se realizó con el kit True Methyl® oxBS Module (NuGEN Technologies) de acuerdo a las instrucciones de uso del kit. En resumen, 1 µg de DNA fue sujeto a oxidación seguido por modificación con bisulfito de sodio (oxBS)

y otro 1 µg de la misma muestra fue sometido solo a la modificación con bisulfito de sodio (BS). El DNA fue purificado utilizando columnas con perlas magnéticas, ambas muestras fueron desnaturalizadas por 30 min. Un microlitro de la solución de oxidación del kit fue adicionada a la muestra oxBS, mientras que 1 µL de agua fue adicionado a la muestra BS. Las muestras fueron incubadas a 40 °C por 30 min en un termociclador y centrifugadas por 10 min a 14,000 G. Los sobrenadantes fueron desechados y sometidos a modificación utilizando bisulfito de sodio. Posteriormente las muestras fueron desulfonadas y lavadas con los buffers incluidos en el kit (NuGEN Technologies). Por último el DNA fue cuantificado para entrar al protocolo del arreglo.

Infinium MethylationEPIC BeadChip

Alrededor de 500 ng de DNA por muestra entraron al protocolo de trabajo del Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, Inc). Durante este proceso el DNA fue desnaturalizado, neutralizado y preparado para amplificación, posteriormente se fragmento y precipito, después fue resuspendido y colocado en la plataforma del arreglo. Al finalizar la hibridación se realizó un protocolo de tinción y después los lavados. Por último el escaneo del Chip se realizó en el Illumina Hi Scan SQ. Una vez que el escaneo se completó los datos fueron procesados en el programa Genome Studio y R (versión 3.5.1).

Pre-procesamiento de datos y análisis de metilación diferencial.

El control de calidad de los datos se evaluó con Genome Studio V2011.1, en función de las sondas de control interno presentes en la matriz. Los pasos de pre-procesamiento, normalización y corrección se realizaron utilizando el lenguaje de programación R (versión 3.5.1) con paquetes de bioconductor (versión 3.8). El procesamiento fue una secuencia de funciones en R utilizando los paquetes minfi, ChAMP y bioconductor. Nuestro conjunto de datos se normalizó utilizando la normalización funcional implementada en el paquete minfi (BMIQ). Este algoritmo no se basa en ningún supuesto biológico y, por lo tanto, es adecuado para los casos en que se esperan cambios globales en los niveles de metilación, como en las

comparaciones de cáncer vs normal. Los valores de detección p se calcularon con el paquete minfi, y se examinaron los valores medios de detección p en todas las muestras para identificar cualquier muestra fallida. Las sondas con un valor de p de detección $>0,01$ en al menos una muestra se descartaron. Se filtraron las sondas que contenían un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el sitio de interrogación CpG y en la extensión de un solo nucleótido para cualquier frecuencia de alelo menor (MAF), y las sondas que contenían un SNP en el cuerpo de la sonda. Se eliminaron las sondas de reactividad cruzada. Las sondas dirigidas a los cromosomas X y Y también se descartaron. Los niveles de metilación se expresaron como valores beta (β). Los valores β se utilizaron para la visualización y la interpretación intuitiva de los resultados, así como para el análisis de metilación diferencial. Las sondas metiladas diferencialmente (DMP) entre HeLa-Control y HeLa-DsiHOTAIR se detectaron con funciones del paquete ChAMP. Solo los DMPs con un valor de $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

KEGG de enriquecimiento de la vía de DMPs.

Como base de conocimiento para el análisis sistemático y completo de las funciones de los genes en las vías, KEGG vincula la información genómica con la información de funciones de nivel superior. La base de datos del GSEA es una base importante para el análisis funcional de genes de alto rendimiento. ClueGO (versión 2.2.3) es una aplicación complementaria de Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) que permite el análisis de enriquecimiento de la ruta KEGG utilizando bases de datos distintas de la base de datos DAVID. Para analizar los DMPs a nivel funcional, se realizó el análisis de la ruta KEGG utilizando Cytoscape y ClueGo. Las rutas que incluyen 8 o más DEG se muestran en las figuras de ClueGo-KEGG.

Integración de red de interacción proteína-proteína (PPI)

La base de datos de la HumanBase es una herramienta en línea diseñada para evaluar la información de proteína-PPI. HumanBase construye mapas funcionales a escala genómica de tejidos humanos al integrar una colección de conjuntos de datos que cubren miles de experimentos contenidos en más de 14,000 publicaciones distintas. Se evalúa automáticamente cada conjunto de datos por su relevancia para cada uno de los 144 contextos funcionales específicos del linaje de tejidos y células. Este enfoque le permite a HumanBase perfilar la función especializada de los genes de una manera de alto rendimiento, incluso en tejidos y linajes celulares para los cuales no existen o existen pocos datos específicos de tejidos.

V. RESULTADOS

Disminución de la expresión de HOTAIR mediante DsiRNA en la línea celular HeLa

Previamente se ha reportado que la línea celular HeLa expresa niveles altos de HOTAIR comparado con otras líneas celulares de cáncer cervical y con células no tumorales (Kim *et al.*, 2014). En este trabajo se valoró si HOTAIR afecta la metilación de genes involucrados en cáncer cervical, para esto, previamente realizamos la disminución de la expresión de HOTAIR mediante RNA de interferencia (Dsi-HOTAIR) y como control se utilizó un DsiRNA control (Dsi-CONTROL). Para valorar la funcionalidad del DsiRNA se midió el nivel de RNA de HOTAIR mediante RT-qPCR y observamos una disminución significativa de alrededor del 80% en los niveles de expresión de HOTAIR (Dsi-HOTAIR) (Figura 1).

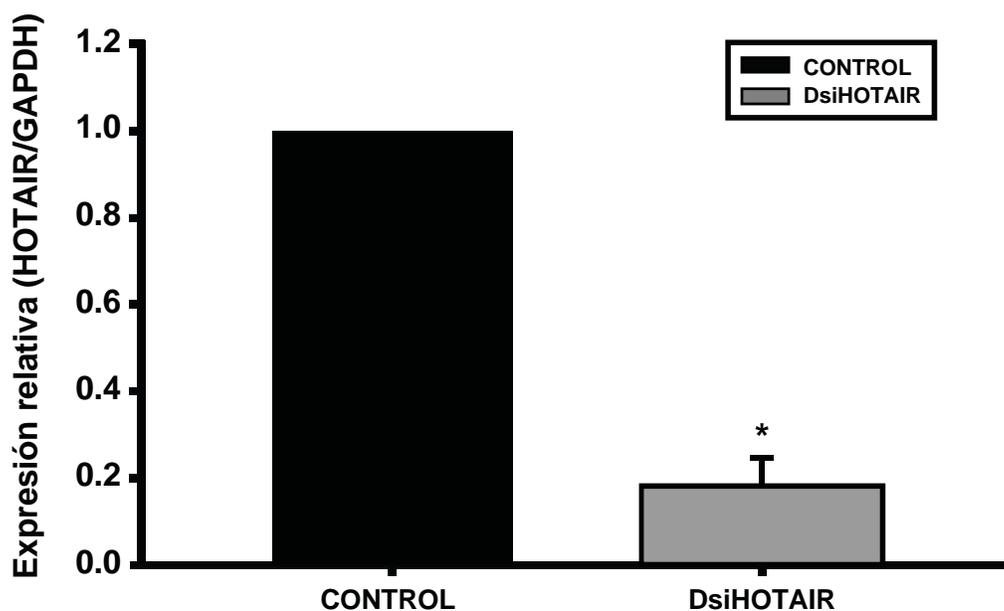


Figura 1. Disminución de la expresión de HOTAIR mediante DsiRNA. Las células HeLa fueron transfectadas con un DsiRNA específico para HOTAIR y un Dsi-CONTROL. La expresión de HOTAIR fue determinada por RT-qPCR y normalizada respecto a GAPDH (método comparativo C_T). Los resultados son expresados como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

Efecto de HOTAIR en el nivel de RNAm de DNMTs en la línea celular HeLa

Una vez confirmada la disminución de la expresión de HOTAIR, se valoró su efecto en la expresión del RNAm de DNMTs de mantenimiento (DNMT1) y DNMTs *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) mediante RT-qPCR, debido a que, las DNMTs son las encargadas de la metilación del DNA, y cambios en su expresión pueden resultar en cambios en la metilación global (Li *et al.*, 2017). En este sentido, en algunos tipos de cáncer se ha reportado que HOTAIR puede afectar el nivel de expresión de DNMTs (Fang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). En la gráfica observamos que el nivel de expresión de DNMT1 disminuye ligera pero significativamente, mientras que el nivel de expresión de DNMT3A aumentó significativamente alrededor de 2 veces, y observamos que no hubo cambio en el nivel de expresión de DNMT3B (Figura 2). Estos resultados indican que HOTAIR afecta la expresión de DNMT1 y DNMT3A y podría por lo tanto afectar la metilación en la línea celular HeLa.

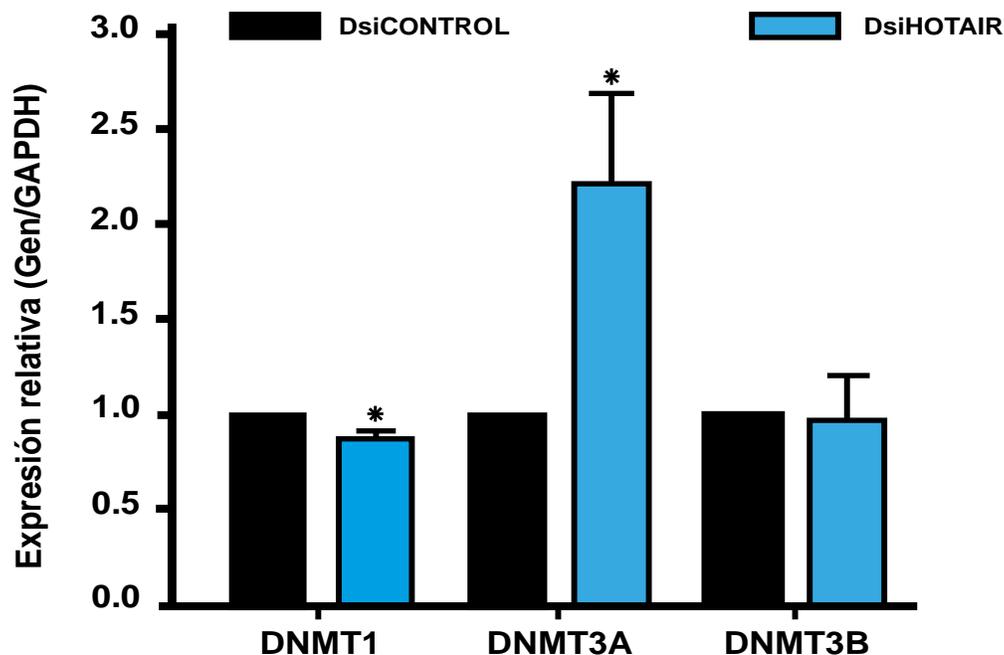


Figura 2. Efecto de HOTAIR en DNMTs. Las células HeLa fueron transfecadas con un DsiRNA específico para HOTAIR por 48 horas, como control se utilizaron células HeLa transfecadas con un interferente control (Dsi-CONTROL). La expresión de DNMT1, DNMT3A Y DNMT3B fue analizada por RT-qPCR y normalizada respecto a GAPDH. Los resultados son expresados en media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$

Efecto de HOTAIR en la metilación global: control de calidad de datos de metilación

Los niveles de metilación global de las seis muestras analizadas fueron determinados con 866,836 sondas para CpGs en todo el genoma, utilizando el arreglo Methylation EPIC BeadChip. El control de calidad basado en las sondas de control interno presentes en la matriz, que incluyen la eficiencia de conversión con bisulfito de sodio, la hibridación, la extensión y la tinción, entre otros, indican que los datos de metilación del DNA genómico cumplen con los requisitos de calidad requeridos. Se realizó un proceso de filtración de datos para aquellas sondas que detectaron sitios no CpG, CpGs con un valor de p de detección >0.01 , CpGs que contenían un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), CpGs de reactividad cruzada y sondas dirigidas a los cromosomas X y Y, quedando 758,073 sondas para el análisis. Los niveles de metilación de estos 758,073 CpGs se expresaron como valores beta (β) los cuales son valores de metilación que van de 0 a 1, donde 0 significa sin metilación y 1 es completamente metilado. En la figura 3 se presenta la distribución de los niveles de metilación de las muestras, las cuales presentaron, como se esperaba, una distribución bimodal para los valores β , con dos picos que indican los estados totalmente metilados y no metilados característicos de los datos de metilación del DNA (figura 3).

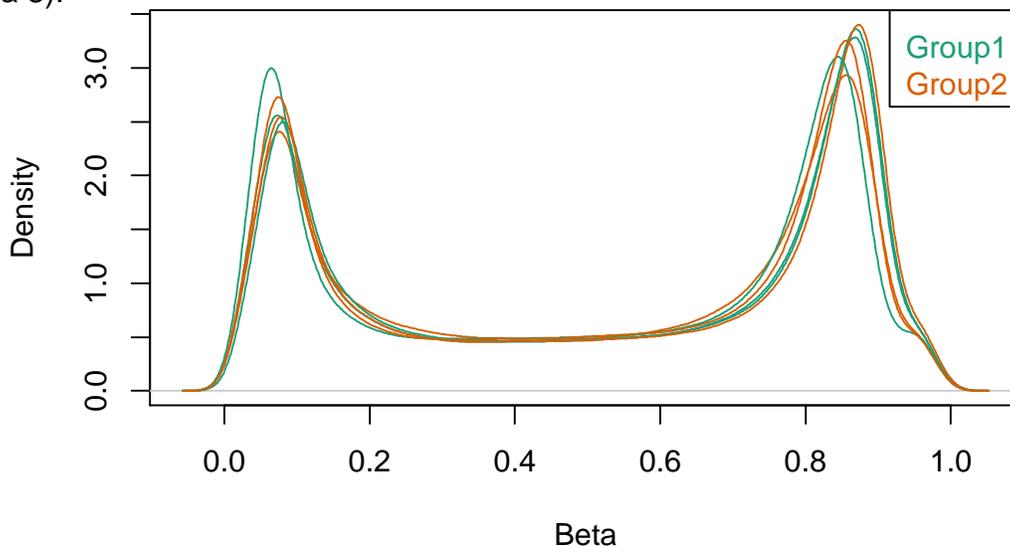


Figura 3. Control de calidad de datos de metilación. Distribuciones de densidad de datos de metilación. Distribución de densidad de los valores beta (0 a 1) de los 758,073 CpG analizados en las seis muestras, Grupo 1 (3 muestras HeLa-Control) y Grupo 2 (3 muestras HeLa-HOTAIR).

Metilación diferencial

Una vez que se verificó la calidad técnica de las seis muestras, se realizó el análisis de metilación diferencial para detectar que sitios CpGs se encuentran hipometilados e hipermetilados posterior a la disminución de HOTAIR. Para esto se realizó un análisis de CpGs metilados diferencialmente (DMP), el cual toma en cuenta un valor de $p < 0,05$ y valores de metilación diferencial ($\Delta\beta$) $> 0,075$. Comparando nuestros dos grupos (HeLa-DsiCONTROL vs HeLa-DsiHOTAIR) y obteniendo los valores $\Delta\beta$, se encontraron 795 DMPs (Fig. 4a y b), de los cuales 170 CpGs resultaron con disminución de metilación y 625 con aumento en la metilación (Fig.4c). También se analizó si los DMPs correspondían mayormente a un cromosoma en particular (Fig. 4d), pero estos se distribuyeron en todos los cromosomas sin alguna particularidad.

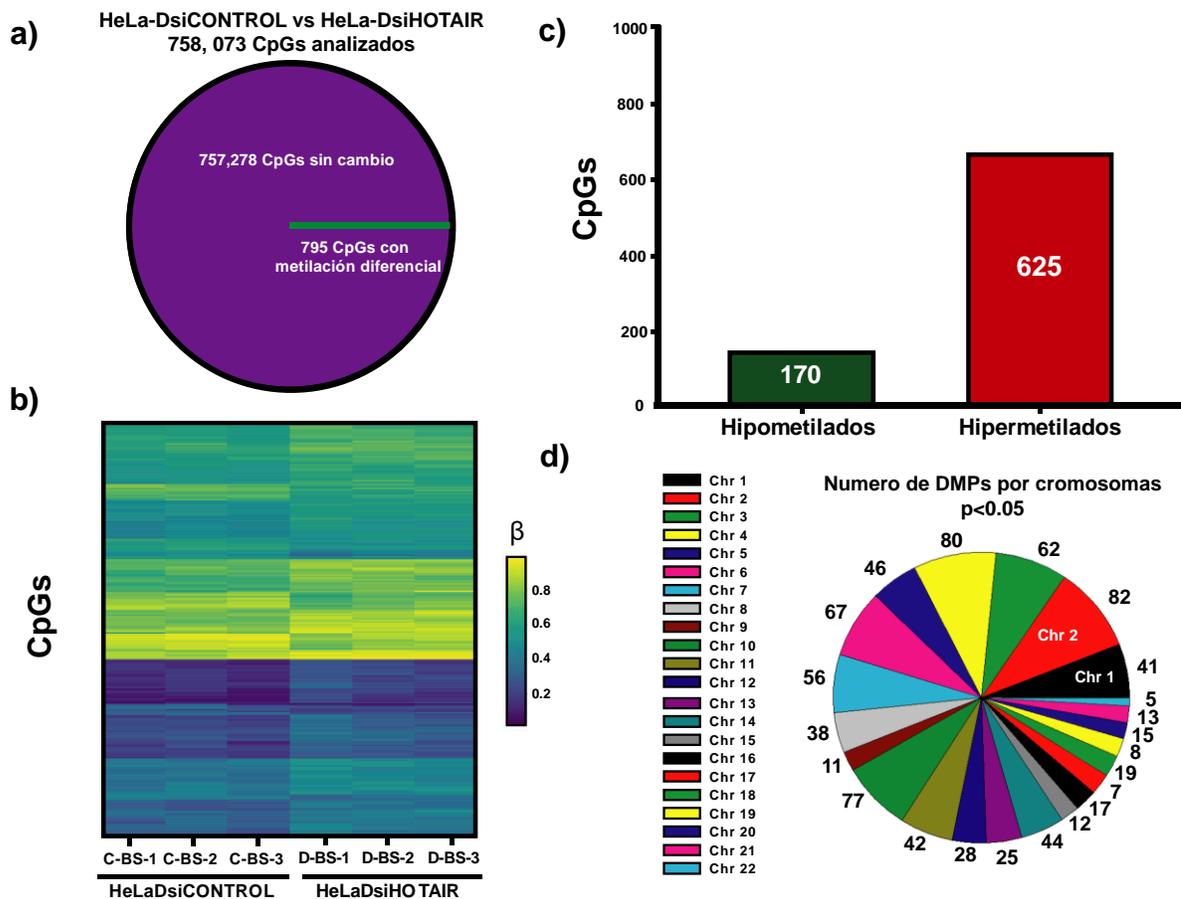


Figura 4. Análisis de DMPs con valores β de metilación. De 754,073 CpGs analizados solo 795 resultaron con cambios en la metilación (a). El Mapa de calor incluye los 795 DMPs con los valores β y $p \leq 0.05$ (b). En 170 CpGs disminuyó la metilación y en 625 aumentó la metilación (c). Distribución del número de DMPs por cromosoma (d).

Cambios de metilación en islas CpGs, shore, shelf y en opensea

Se ha reportado que la metilación ocurre generalmente en islas CpGs (región de DNA de alrededor de 300 pb con >60% de CG), islas shore (región a 2kb de una isla CpG), islas shelf (región a 4 kb de una isla CpG), e incluso en regiones fuera de estas islas (opensea), ya que la metilación en alguna de estas regiones puede tener implicaciones importantes en la unión de factores y moléculas que alteran la expresión de genes (Irizarry *et al.*, 2009; Sofer *et al.*, 2013), así también, se ha encontrado que algunos lncRNAs pueden afectar la metilación de regiones particulares (Bure *et al.*, 2018). En la figura 5 podemos observar que las regiones fuera de las islas (opensea) tienen el mayor cambio en la metilación, y que este cambio es tanto de hipermetilación como de hipometilación, lo cual nos indica que HOTAIR posiblemente puede tener preferencia para afectar la metilación de estas regiones de manera dual (hipermetilación e hipometilación).

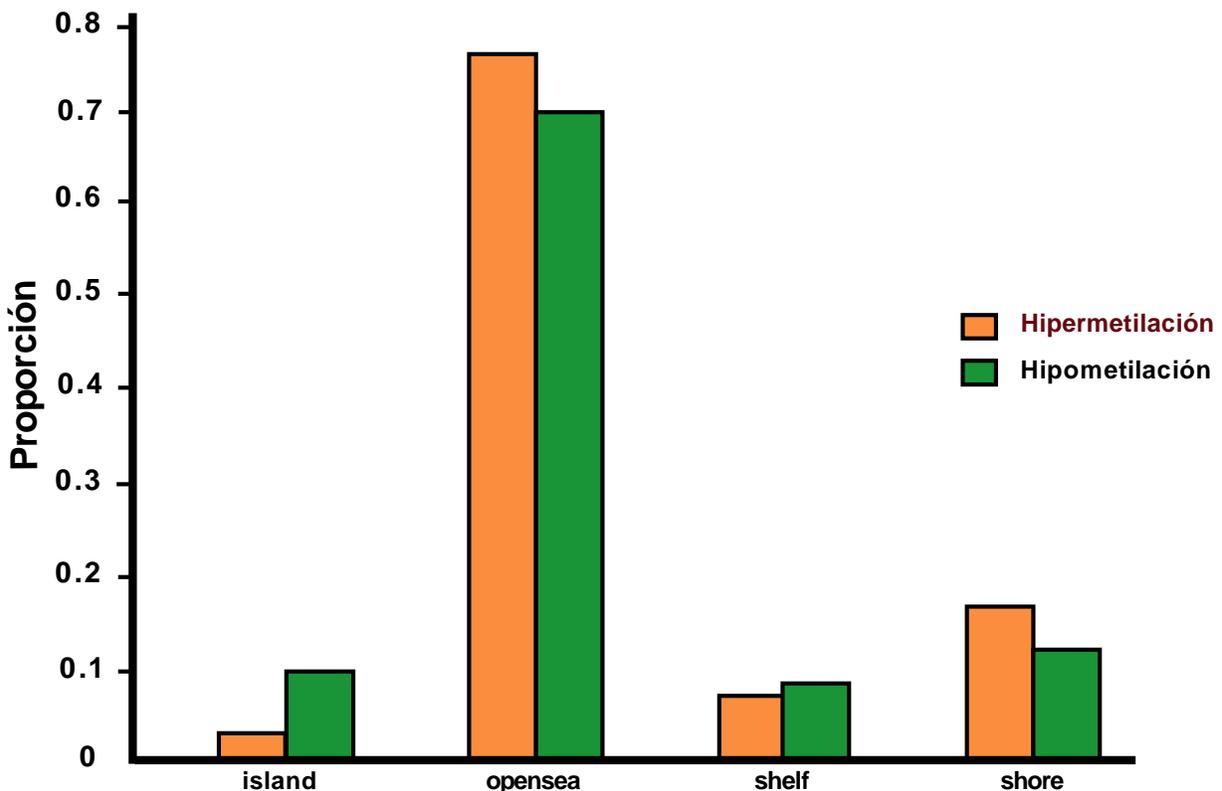


Figura 5. Distribución de metilación diferencial en regiones genómicas. Esta grafica incluye la proporción de metilación diferencial en islas CpG, shore, shelf y regiones fuera de estas islas (opensea). Se muestra la hipermetilación e hipometilación de cada una de las regiones.

Cambios de metilación en genes

Los cambios de metilación en island, shore, shelf y opensea, se pueden localizar en alguna región dentro de los genes, ya sea en el primer exón (1stExon), en las regiones UTR (3' UTR y 5' UTR), en regiones intergénicas (IGR), en el cuerpo del gen (Body), 20 bases al final o al inicio de un exón (ExonBnd) o en la región promotora (TSS1500 y TSS200), y dependiendo de la región afectada, es la consecuencia de la metilación en un gen en particular. Esto es importante debido a que hay reportes de que la metilación tiene una importante implicación en cada una de estas regiones (Schübeler, 2015; Yang *et al.*, 2014). Nosotros observamos mayores cambios de metilación (hipermetilación e hipometilación) en el cuerpo del gen (Body) y en las regiones intergenicas (IGR), sugiriendo que HOTAIR tiene un papel en la metilación de estas regiones. Esto es importante debido a que hay muy poca información acerca de la consecuencia que puede tener la metilación en estas regiones (Figura 6).

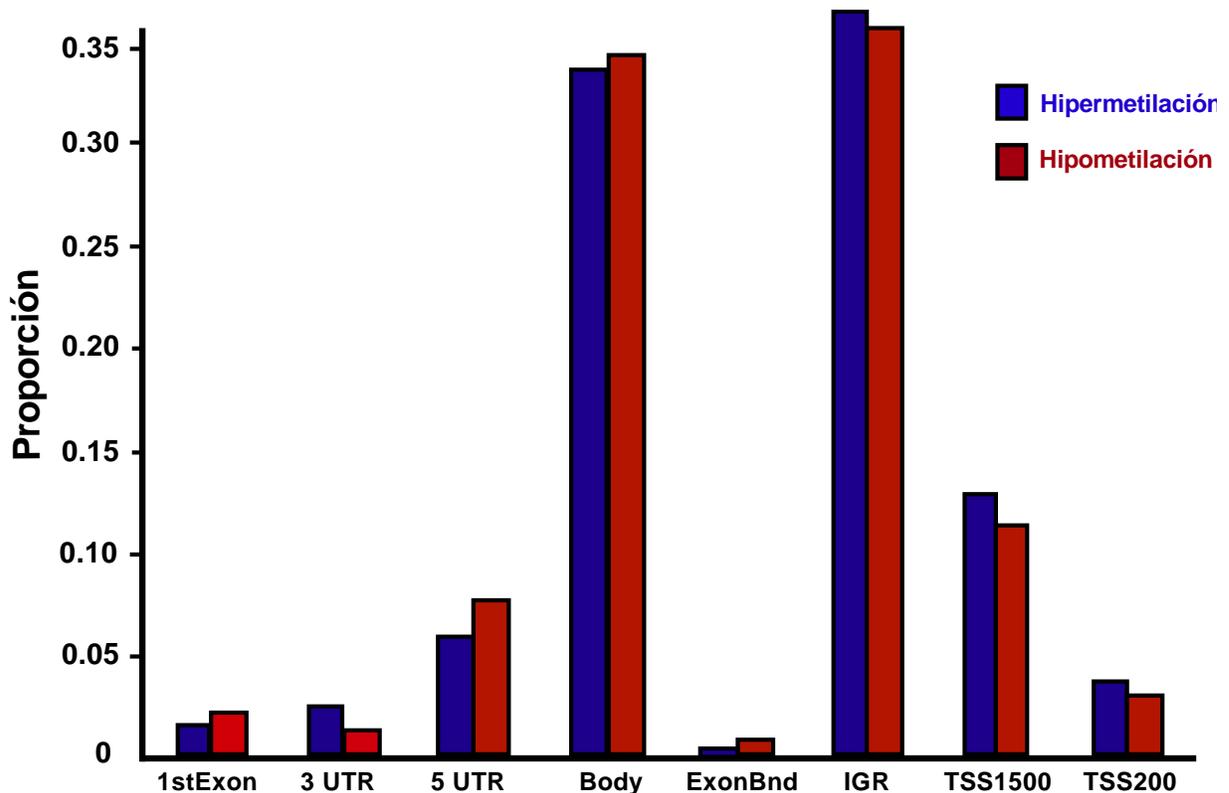


Figura 6. Distribución de metilación diferencial en genes. Esta grafica incluye la proporción de sondas hipo e hipermetiladas de las regiones 1stExon, 3 UTR, 5 UTR, Body, IGR, ExonBnd, TSS1500, TSS200.

Distribución de CpGs significativos en todas las regiones genómicas analizadas

Debido a la importancia de la metilación en las regiones anteriormente mencionadas, se realizó una gráfica para ver en qué regiones de manera dual cambia la metilación por la disminución de HOTAIR, encontrando más cambios fuera de las islas (opensea), dentro del cuerpo del gen (body) y en regiones IGR (regiones intergénicas). Esto sugiere que HOTAIR afecta la metilación principalmente en estas regiones (Figura 7).

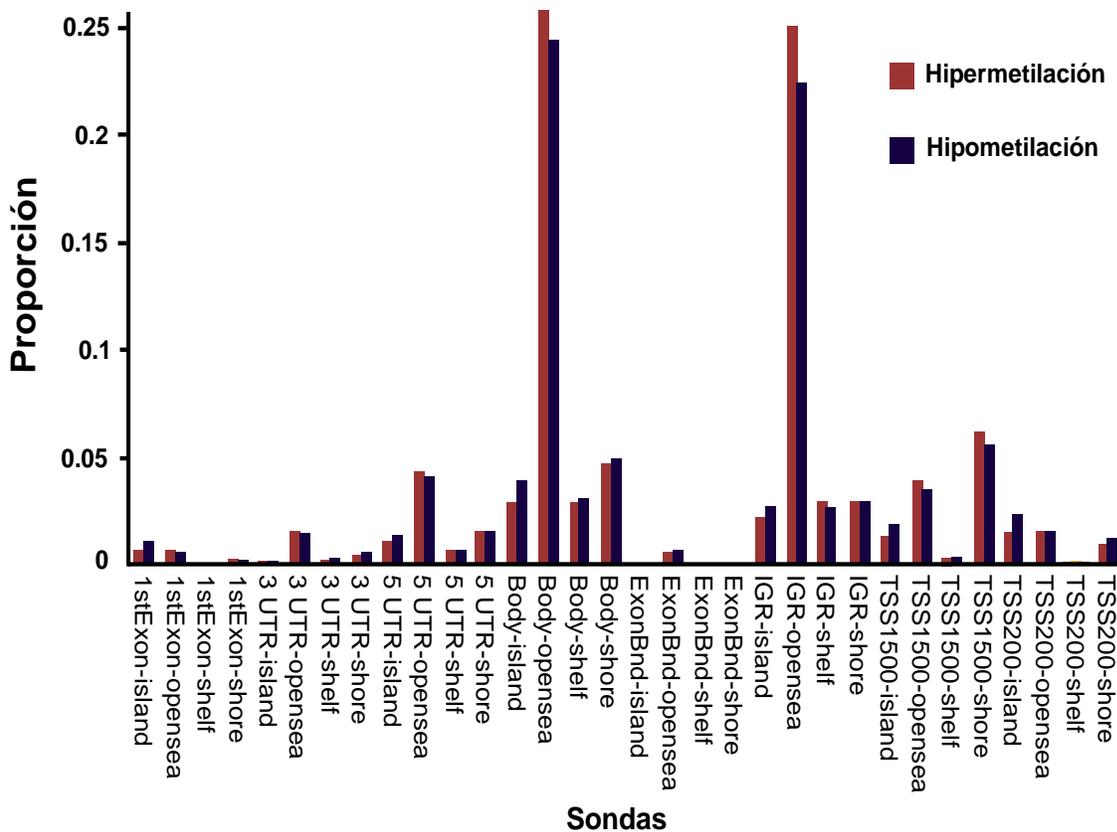


Figura 7. Distribución de metilación diferencial en todas las regiones genómicas analizadas. Esta gráfica incluye la metilación diferencial de todas las regiones analizadas en conjunto. Body-opensea eh IGR-opensea son las regiones con mayor metilación diferencial.

Análisis de enriquecimiento de vías (KEGG)

Se realizó un análisis de enriquecimiento de vías (KEGG) para saber el posible impacto biológico de los genes diferencialmente metilados. Esto se analizó a partir de 488 genes reconocidos por la base de datos GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), de los cuales 104 genes disminuyen su metilación y 384 aumenta su metilación. Nosotros observamos que estos genes se encontraron involucrados con: moléculas de adhesión celular (CAMs), endocitosis, funciones adherentes, vía de señalización WNT y vía de señalización jak-STAT.

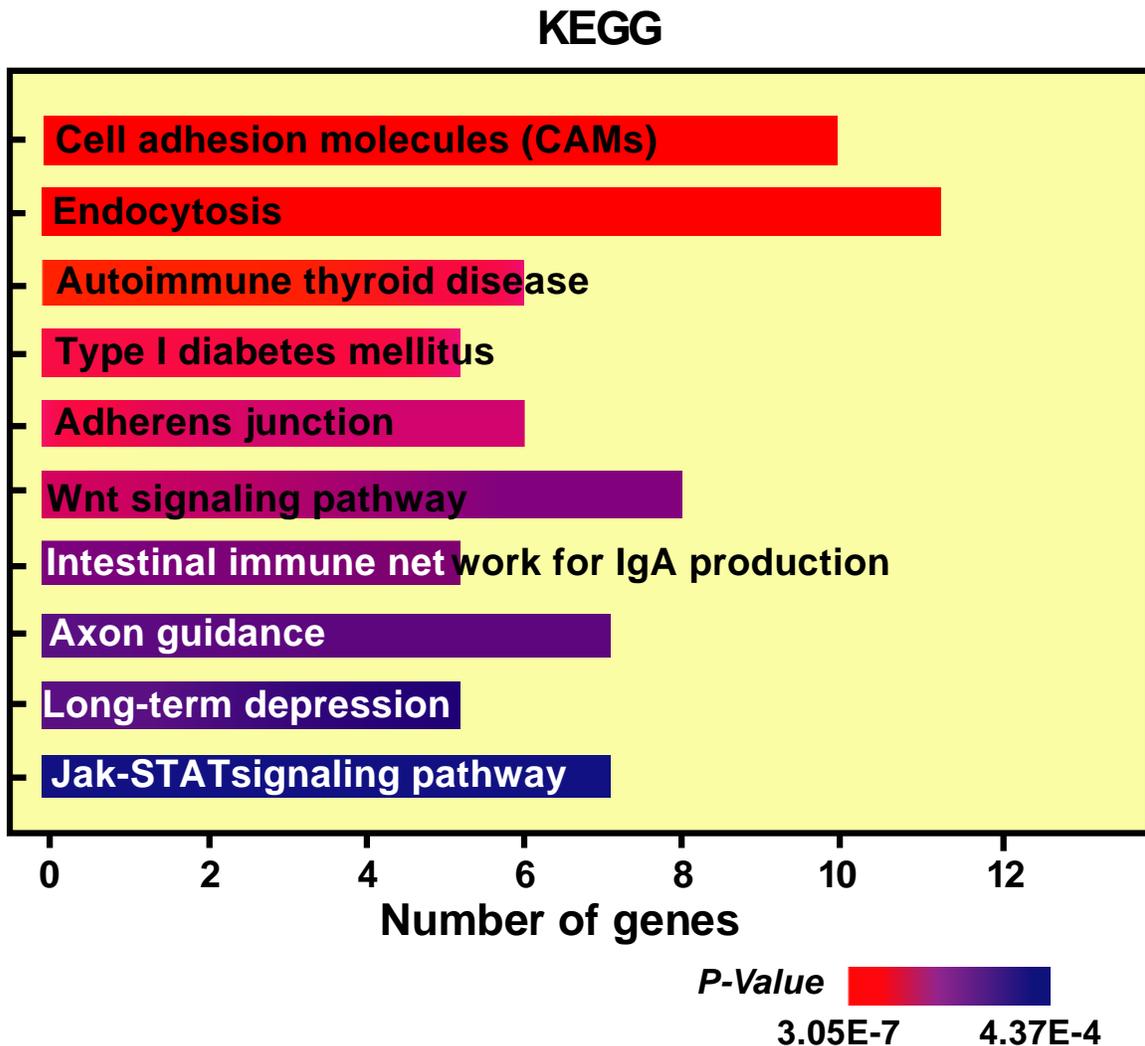


Figura 8. Análisis KEGG. Análisis de 488 genes reconocidos por el GSEA. Las vías resultantes fueron moléculas de adhesión celular, endocitosis, vía de señalización WNT, funciones adherentes, etc. En la parte inferior se aprecia el número de genes encontrados en cada vía, y en código de color la significancia por valor de p .

Metilación en genes relacionados con vías en cáncer

Para hacer un análisis más específico de la posible implicación biológica de la metilación en este conjunto de genes, en la figura 10 se muestra el nivel de metilación diferencial (valor $\Delta\beta$) de los 50 genes con mayor hipermetilación y los 50 con menor hipometilación. Como se puede observar algunos de estos genes tienen funciones importantes como: PHF13 (modulador de la estructura de la cromatina), DOCK10 (factor intercambiador de nucleótidos de guanosina), TBX3 (represor transcripcional involucrado con procesos de desarrollo), SOX30 (factor de la transcripción involucrado con desarrollo embrionario), UBR3 (proteína ubiquitin ligasa), SETD2 (histona metiltransferasa relacionada con organización de la cromatina), CCNA2 (ciclina A2) Y PRMT2 (metiltransferasa).

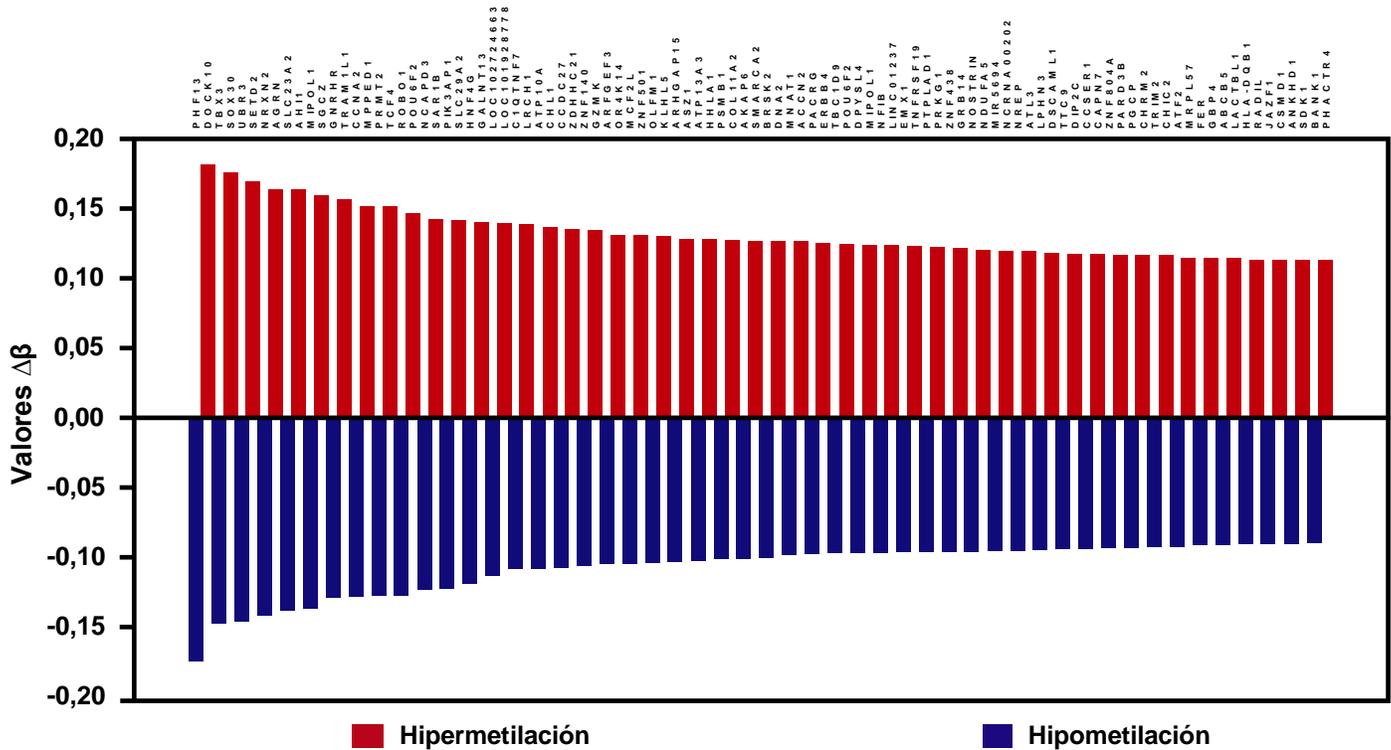
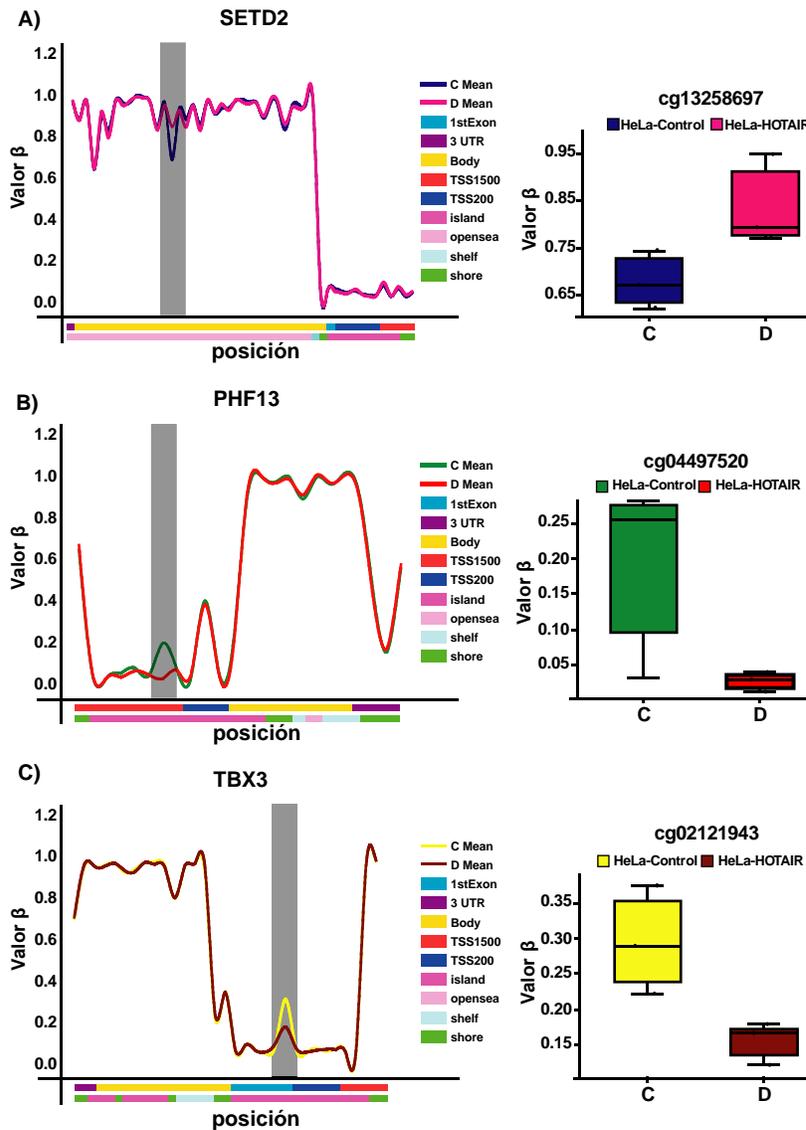


Figura 10. Valores de metilación diferencial de 100 genes. Esta grafica incluye 100 genes de los cuales 50 tienen aumento en la metilación (valor $\Delta\beta$ +) y 50 disminución en la metilación (valor $\Delta\beta$ -). Cada barra representa el valor de metilación diferencial entre nuestras dos condiciones (HeLa-Control vs HeLa-HOTAIR).

Análisis de metilación en SETD2, PHF13 y TBX3

Para hacer un análisis de metilación más específico se tomaron 3 genes de la gráfica anterior (SETD2, PHF13 y TBX3) debido a que estos participan en regulación de la cromatina y regulación transcripcional (procesos relacionados con HOTAIR). En la figura 11 se observa el nivel de metilación en todas las regiones de los 3 genes



analizados por separado, resaltando la región con metilación diferencial entre HeLa-Control vs HeLa-HOTAIR. Como se puede observar SETD2 tiene un aumento en la metilación en el cuerpo del gen, mientras que PHF13 presenta disminución en la metilación en su promotor (TSS1500) y TBX3 presenta disminución en la metilación entre el primer exón (1stExon) y el promotor (TSS200).

Figura 11. Metilación en SETD2, PHF13 y TBX3. Representación del nivel de metilación de todos los CpGs analizados en SETD2 (A), PHF13 (B) y TBX3 (C) en HeLa-Control vs HeLa-HOTAIR. La parte oscura denota el cambio de metilación diferencial en un CpG, del lado derecho se observa el valor de metilación del CpG diferencialmente metilado para los 3 genes.

Red de interacción proteína-proteína de SETD2, PHF13 y TBX3

Para tener una idea del impacto funcional de la metilación en SETD2, PHF13 y TBX3 se realizó una red de interacción proteína-proteína utilizando la base Tissue-specific gene networks (GIANT) (giant.princeton.edu) (Greene *et al.*, 2015). GIANT detalla la función de la proteína y las interacciones en multi - tejidos humanos y linajes celulares, además también nos proporciona los procesos biológicos en los que la red de proteínas puede estar implicada. Los procesos involucrados con esta red fueron: morfogénesis, regulación positiva del silenciamiento génico pos-transcripcional, localización de proteínas a la cromatina, regulación de la expresión génica (epigenética), cambio de conformación del DNA, entre otros. Este resultado es muy interesante debido a que la función principal de HOTAIR es la remodelación de la cromatina mediante reclutamiento de proteínas al DNA para llevar a cabo la regulación de la expresión de sus genes blanco (Tsai *et al.*, 2010).

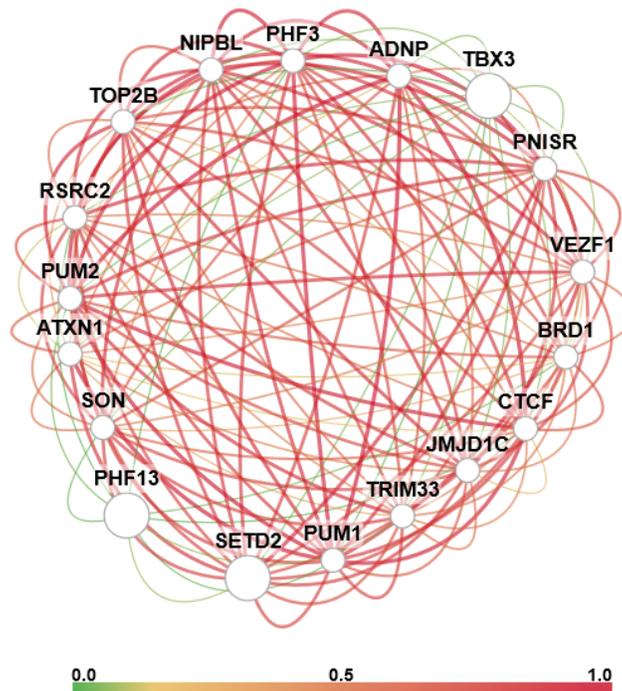


Figura 12. Red de interacción proteína - proteína de SETD2, PHF13 y TBX3. Esta red muestra la interacción de 15 proteínas con SETD2, PHF13 y TBX3. Las líneas de interacciones entre las proteínas tienen valores que van de 0 (verde) a 1 (rojo) donde 0 significa menor intervalo de confianza y 1 mayor intervalo de confianza en la interacción.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La metilación del DNA tiene un importante papel en la regulación transcripcional, el remodelamiento de la cromatina y en estabilidad genética (Edwards *et al.*, 2017). Se ha reportado que los patrones de metilación aberrantes del DNA participan de manera importante en la carcinogénesis cervical y que estos patrones de metilación progresan conforme avanzan las lesiones cervicales (Bhat *et al.*, 2016), por lo tanto se ha aceptado que la metilación juega un papel importante en este tipo de cáncer en particular (Bhat *et al.*, 2016; Piyathilake *et al.*, 2017).

A pesar de conocer la importancia de la metilación en cáncer cervical, actualmente se desconoce casi en su totalidad como es que la metilación ocurre en regiones particulares del genoma, específicamente en genes supresores de tumor y en oncogenes. En este sentido recientemente ha sido reportado que los lncRNAs pueden afectar la metilación de sus genes blanco (Zhao *et al.*, 2016). HOTAIR es un RNA largo no codificante intergénico (Tsai *et al.*, 2010) y ha servido como paradigma de la regulación epigenética a través de su capacidad de servir como un andamio molecular. Se ha descrito que HOTAIR se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer incluyendo cáncer cervical (Huang *et al.*, 2014), así mismo, se ha demostrado que HOTAIR puede afectar la metilación de sus genes blanco para regular su expresión en cáncer laríngeo (Li *et al.*, 2013), cáncer de mama (Lu *et al.*, 2012), cáncer de pulmón (Fang *et al.*, 2016) y cáncer gastrointestinal (Hofmann *et al.*, 2015), pero no hay reportes en cáncer cervical.

Nuestros resultados muestran que la disminución en la expresión de HOTAIR afectó la expresión de DNMT1 y DNMT3A pero no de DNMT3B. Actualmente se ha reportado que HOTAIR puede afectar la expresión de DNMTs y de esta manera afectar la metilación de genes (Li *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2016). Un reporte en osteosarcoma muestra que al disminuir a HOTAIR, disminuye la expresión de DNMT1, esto debido a que HOTAIR ya no inhibe a miR-126 un regulador negativo de DNMT1 provocando disminución en su expresión y por ende disminución global en la metilación de células U2OS (Li *et al.*, 2017). Finalmente, también hay evidencia de que la disminución de

DNMT1 en la línea celular HeLa provoca de-metilación en los promotores de genes supresores de tumor (Zhang *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha reportado que DNMT3A se encuentra sobre-expresada en diferentes tipos de cáncer incluyendo cáncer cervical (Narayan *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2015). Actualmente no hay reportes de la relación de HOTAIR y DNMT3A, sin embargo, nosotros observamos que al disminuir a HOTAIR aumenta la expresión de DNMT3A, esto puede provocar cambios en la metilación de regiones blanco de DNMT3A, por ejemplo cambios de metilación en el cuerpo de los genes (Raddatz *et al.*, 2012). Por lo anterior, la disminución en la expresión de DNMT1 y el aumento de DNMT3A por HOTAIR, puede resultar en cambios en la metilación a nivel global en regiones y genes importantes para una célula tumoral.

El análisis de metilación global posterior a la disminución de HOTAIR resulto en cambios en la metilación de 795 sitios CpGs, de los cuales 170 resultaron con disminución y 625 con aumento en la metilación (figura 4a y b). Un estudio anterior, realizado en cáncer gastrointestinal (Bure *et al.*, 2018) encontró alrededor de 500 y 400 sitios CpGs con cambios en el nivel de metilación por disminución de HOTAIR, muy similar a lo que encontramos. Nosotros analizamos si los cambios en la metilación se encontraban mayormente en un cromosoma en particular debido a que hay lncRNAs asociados a enfermedades genéticas (Huarte, 2015), sin embargo, observamos que los cambios estaban distribuidos en todos los cromosomas. Posteriormente realizamos un análisis de distribución de CpGs con metilación diferencial, para saber si los cambios de metilación se encontraban en alguna región en particular del genoma, y si estos cambios ocurrían en islas CpGs (región de DNA de alrededor de 300 pb con >60% de CG), islas shore (región a 2kb de una isla CpG), islas shelf (región a 4 kb de una isla CpG), e incluso en regiones fuera de estas islas (opensea).

Encontramos que la mayor parte de los cambios ocurrieron en el cuerpo de los genes y en regiones intergénicas de manera dual, es decir, hubo hipometilación e hipermetilación con una tendencia muy similar entre las diferentes regiones. Un estudio

reciente reportó que HOTAIR puede llevar a cabo tanto la hipometilación e hipermetilación para regular la expresión de sus genes blanco (Bure *et al.*, 2018).

A pesar de esto, la metilación en estas regiones no ha sido muy estudiada y se desconoce en gran parte la implicación biológica que esto pueda conllevar. Algunos estudios de metilación en cáncer muestran resultados similares en la metilación de estas regiones (Nishida *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2014). Por ejemplo, un estudio de bases de datos reportó que a mayor metilación en el cuerpo de los genes mayor expresión, pero a la vez, que la metilación en el cuerpo de los genes afecta la expresión de estos de una manera no convencional, es decir, encontraron que niveles altos de metilación se relaciona con una expresión intermedia y que bajos niveles de metilación se asocia con alta y baja expresión de genes (Jjingo *et al.*, 2012), por ello el papel de la metilación en estas regiones no está bien entendido. Por otra parte, las regiones intergénicas generalmente contienen transposones y estos necesitan estar metilados para permanecer estables, por ello, se ha encontrado que cambios en su metilación puede provocar inestabilidad genética (Suzuki y Bird, 2008). Además las regiones intergénicas contienen regiones ultra conservadas que pueden ser reguladas vía metilación (Lujambio *et al.*, 2010), y estas regiones pueden encontrarse río arriba de promotores de genes, afectando su transcripción dependiendo de su estado de metilación (Rauscher *et al.*, 2015).

Debido a que encontramos cambios en la metilación de regiones particulares (figura 8), realizamos un KEGG para saber la posible implicación biológica de la metilación en nuestro conjunto de genes. Nosotros observamos que los genes están involucrados con moléculas de adhesión celular (CAMs), endocitosis, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus tipo II, funciones adherentes, vía de señalización WNT y vía de señalización jak-STAT, esto utilizando la base de datos del GSEA y de manera muy similar utilizando ClueGO. Este resultado fue muy interesante debido a que HOTAIR promueve la migración e invasión celular en la línea celular HeLa, además de que hay reportes directos de que HOTAIR afecta la vía WNT en HeLa (Lee *et al.*, 2016; Klm *et al.*, 2015) y en nuestro grupo de trabajo.

Posteriormente para hacer un análisis más específico, tomamos los 50 genes con mayor y menor metilación, encontrando que algunos de estos tienen funciones importantes como: modulador de la estructura de la cromatina (PHF13), factor intercambiador de nucleótidos de guanosina (DOCK10), represor transcripcional involucrado con procesos de desarrollo (TBX3), factor de la transcripción involucrado con desarrollo embrionario (SOX30), proteína ubiquitin ligasa (UBR3), histona metiltransferasa relacionada con organización de la cromatina (SETD2 y PRMT2) y ciclina A2 (CCNA2). Esto es interesante debido a que HOTAIR está involucrado de manera normal con desarrollo embrionario (Bhan y Mandal, 2015), y en cáncer se relaciona con la modulación de la estructura de la cromatina a través del reclutamiento de proteínas como metiltransferasas (Hajjari y Salavaty, 2015).

Posteriormente seleccionamos 3 genes, el primero fue SETD2 debido a que codifica para una histona metiltransferasa que trimetila la lisina 36 en la histona H3, también es requerida para la reparación de la doble cadena del DNA, por ello se reconoce como supresor de tumor y además interactúa con DNMT3A. PHF13 codifica para una proteína que modula la estructura de la cromatina requerida para la mitosis, también es corregulador transcripcional de H3K4me2/3 y se asocia con cáncer de ovario. Y por último TBX3 codifica para un factor transcripcional implicado en la regulación del desarrollo, las mutaciones en este gen causan el síndrome mamario cubital, que afecta las extremidades, las glándulas apocrinas, los dientes, el cabello y el desarrollo genital (www.genecards.org), además también se ha reportado que TBX3 proporciona un importante vínculo entre el desarrollo embrionario y cáncer (Fan *et al.*, 2004; Rowley *et al.*, 2004), ya que se ha relacionado su alta expresión con diferentes tipos de cáncer donde promueve la proliferación y la invasión de tumores (Ito *et al.*, 2005; Lomnytska *et al.*, 2006; Lyng *et al.*, 2006). A pesar del impacto de la expresión de TBX3 poco se sabe sobre su regulación.

Nosotros observamos que la metilación en SETD2 aumento en el cuerpo del gen tras la disminución de HOTAIR. Un estudio realizado en cáncer de hígado encontró que HOTAIR promueve el crecimiento maligno de células madre de cáncer de hígado en ratones a través de la disminución de SETD2, ellos observan que HOTAIR reduce el

reclutamiento de CREBB, P300 y de la RNA pol II al promotor de SETD2, lo cual provoca su represión transcripcional, causando daño al DNA y llevando como consecuencia funcional la proliferación de células y aumento en el tamaño tumoral (Li *et al.*, 2015). Debido a que SETD2 es considerado un supresor de tumor y a que la metilación en el cuerpo del gen se asocia con activación transcripcional nosotros podemos sospechar que el aumento en la metilación de SETD2 podría provocar su activación transcripcional y por lo tanto disminución de la proliferación de manera funcional.

Por otro lado la metilación en PHF13 disminuyó en la región promotora (TS1500). Se ha reportado que PHF13 interactúa con la RNA pol II y PRC2, estabilizando su asociación con un gran número de promotores activos (Fuchs *et al.*, 2017). También participa en ciclo celular y en respuesta de daño al DNA, interactuando directamente con el DNA vía dominios PHD, indicando que puede formar interacciones con cromatina (Chung *et al.*, 2016), sin embargo, se desconoce en gran parte su papel. Debido a que la metilación en la región promotora se asocia con represión transcripcional, la disminución en la metilación de PHF13 puede resultar en aumento en su expresión y por lo tanto cambios en los procesos antes mencionados, procesos asociados fuertemente con HOTAIR.

Por último, observamos disminución de la metilación en el primer exón y al iniciar la región promotora (TSS200) de TBX3. Se ha reportado que TBX3 se sobre-expresa en muchos tipos diferentes de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cuello uterino, ovario, páncreas, hígado y melanomas (Fan *et al.*, 2004; Renard *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2008; Rowley *et al.*, 2004). La investigación para identificar los mecanismos moleculares de TBX3 en la formación de cáncer, reveló que interactúa con proteínas de diferentes vías oncogénicas. En la tumorigénesis hepática, por ejemplo, TBX3 se encuentra río abajo de la vía Wnt- β -catenina, siendo un regulador de β -catenina (Renard *et al.*, 2007) y también reprime a E-cadherina, implicándose con la metástasis de tumores epiteliales (Rodriguez *et al.*, 2008). HOTAIR como ya se mencionó participa en la vía WNT (Klm *et al.*, 2015) y se asocia principalmente con la metástasis

de diferentes tipos de tumor (Gupta *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013), por lo que su papel puede ser llevado en parte mediante la metilación de TBX3.

Finalmente encontramos que SETD2, PHF13 y TBX3 interactúan con diferentes proteínas que en conjunto participan en procesos como: morfogénesis, regulación positiva del silenciamiento génico pos-transcripcional, localización de proteínas a la cromatina, regulación de la expresión génica (epigenética), cambio de conformación del DNA, entre otros. Este resultado es muy interesante debido a que incluye las funciones principales de HOTAIR que son regulación de la expresión génica mediante el reclutamiento de proteínas modificadoras de la cromatina (Hajjari y Salavaty, 2015). Por lo que HOTAIR podría llevar acabo sus funciones principales a través de la metilación de genes particulares en la línea celular HeLa.

En conclusión, estos resultados muestran que HOTAIR afecta la metilación de diferentes genes involucrados con adhesión celular (CAMs), funciones adherentes, vía de señalización WNT y vía de señalización jak-STAT, por lo que es probable que el papel de HOTAIR en la migración e invasión celular sea mediado en parte por la metilación de estos genes particulares.

VII. REFERENCIAS

- Beukers, W., Kandimalla, R., Masius, R. G., Vermeij, M., Kranse, R., Van Leenders, G. J., & Zwarthoff, E. C. (2015). Stratification based on methylation of TBX2 and TBX3 into three molecular grades predicts progression in patients with pTa-bladder cancer. *Modern Pathology*, 28(4), 515.
- Bhan, A., & Mandal, S. S. (2015). LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(1), 151-164.
- Beckedorff, F. C., Amaral, M. S., Deocesano-Pereira, C., Y Verjovski-Almeida, S. (2013). Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics. *Biosci. Rep*, 33(4).
- Bhat, S., Kabekkodu, S. P., Noronha, A., Y Satyamoorthy, K. (2016). Biological implications and therapeutic significance of DNA methylation regulated genes in cervical cancer. *Biochimie*, 121, 298-311.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A. J., Socci, N. D., & Scandura, J. M. (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS one*, 6(1), e14524.
- Bure, I., Geer, S., Knopf, J., Roas, M., Henze, S., Ströbel, P.,...& Haller, F. (2018). Long noncoding RNA HOTAIR is upregulated in an aggressive subgroup of gastrointestinal stromal tumors (GIST) and mediates the establishment of gene-specific DNA methylation patterns. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 57(11), 584-597.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., ... Y Kodzius, R. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740), 1559-1563.
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., ... Y Forrest, A. R. (2012). Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, 491(7424), 454.
- Chen, X., Liu, L., Mims, J., Punzka, E. C., Williams, K. E., Zhao, W., ...& Furdui, C. M. (2015). Analysis of DNA methylation and gene expression in radiation-resistant head and neck tumors. *Epigenetics*, 10(6), 545-561.
- Chung, H. R., Xu, C., Fuchs, A., Mund, A., Lange, M., Staeger, H., ... & Regnard, C. (2016). PHF13 is a molecular reader and transcriptional co-regulator of H3K4me2/3. *Elife*, 5, e10607.
- Cui, X., Jing, X., Y Wu, X. (2017). The prognostic value of long non coding RNAs in cervical cancer: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(37), 62470.
- De Carvalho, D. D., Sharma, S., You, J. S., Su, S. F., Taberlay, P. C., Kelly, T. K., ...Y Jones, P. A. (2012). DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer cell*, 21(5), 655-667.
- Edwards, J. R., Yarychivska, O., Boulard, M., & Bestor, T. H. (2017). DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & chromatin*, 10(1), 23.
- Fan, W., Huang, X., Chen, C., Gray, J., & Huang, T. (2004). TBX3 and its isoform TBX3+ 2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and

- are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. *Cancer research*, 64(15), 5132-5139.
- Fang, S., Gao, H., Tong, Y., Yang, J., Tang, R., Niu, Y., .Y Guo, L. (2016). Long noncoding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells. *Laboratory Investigation*, 96(1), 60.
 - Fang, L., Zhu, Q., Neuenschwander, M., Specker, E., Wulf-Goldenberg, A., Weis, W. I., ...& Birchmeier, W. (2016). A small-molecule antagonist of the β -catenin/TCF4 interaction blocks the self-renewal of cancer stem cells and suppresses tumorigenesis. *Cancer Research*, 76(4), 891-901.
 - Franco, E. L., Duarte-Franco, E., Y Ferenczy, A. (2001). Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Canadian Medical Association Journal*, 164(7), 1017-1025.
 - Fuchs, A., Torroba, M., & Kinkley, S. (2017). PHF13: a new player involved in RNA polymerase II transcriptional regulation and co-transcriptional splicing. *Transcription*, 8(2), 106-112.
 - Gibb, E. A., Vucic, E. A., Enfield, K. S., Stewart, G. L., Lonergan, K. M., Kennett, J. Y., ... Y Lam, W. L. (2011). Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PloS one*, 6(10), e25915.
 - Gong, C., & Maquat, L. E. (2011). lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*, 470(7333), 284.
 - Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., ... & Wang, Y. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071.
 - Hajjari, M., & Salavaty, A. (2015). HOTAIR: an oncogenic long non-coding RNA in different cancers. *Cancer biology & medicine*, 12(1), 1.
 - Hofmann, S., Bure, I., Agaimy, A., Hartmann, A., Haller, F. y Moskalev, E. (2015) Long non-coding RNA HOTAIR affects DNA methylation patterns in gastrointestinal stromal tumours (GIST), *European Journal of Cancer Supplements*, 13,1, 20-21.
 - Huang, L., Liao, L. M., Liu, A. W., Wu, J. B., Cheng, X. L., Lin, J. X., Y Zheng, M. (2014). Overexpression of long noncoding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with cervical cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 290(4), 717-723.
 - Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature medicine*, 21(11), 1253.
 - Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., ... & Ji, H. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, 41(2), 178.
 - Ito, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Takahashi, S., & Shirai, T. (2005). Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. *Cancer letters*, 219(1), 105-112.

- Jjingo, D., Conley, A. B., Soojin, V. Y., Lunyak, V. V., & Jordan, I. K. (2012). On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget*, 3(4), 462.
- Kanwal R., Gupta K., Gupta S. (2015) *Cancer Epigenetics: An Introduction*. In: Verma M. (eds) *Cancer Epigenetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (pp. 3-25) vol 1238. Humana Press, New York, NY.
- Kim, H. J., Lee, D. W., Ylm, G. W., NAm, E. J., Kim, S., KIm, S. W., Y KIm, Y. T. (2014). Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *International journal of oncology*, 46(2), 521-530.
- KIm, H. J., Lee, D. W., Ylm, G. W., NAm, E. J., Kim, S., KIm, S. W., & KIm, Y. T. (2015). Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. *International journal of oncology*, 46(2), 521-530.
- Lee, M., Kim, H. J., Kim, S. W., Park, S. A., Chun, K. H., Cho, N. H., ... & Kim, Y. T. (2016). The long non-coding RNA HOTAIR increases tumour growth and invasion in cervical cancer by targeting the Notch pathway. *Oncotarget*, 7(28), 44558.
- Lee, N. K., Lee, J. H., Kim, W. K., Yun, S., Youn, Y. H., Park, C. H., ... Y Lee, S. K. (2016). Promoter methylation of PCDH10 by HOTAIR regulates the progression of gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget*, 7(46), 75307.
- Li, H., An, J., Wu, M., Zheng, Q., Gui, X., Li, T., ... & Lu, D. (2015). LncRNA HOTAIR promotes human liver cancer stem cell malignant growth through downregulation of SETD2. *Oncotarget*, 6(29), 27847.
- Li, X., Lu, H., Fan, G., He, M., Sun, Y., Xu, K., Y Shi, F. (2017). A novel interplay between HOTAIR and DNA methylation in osteosarcoma cells indicates a new therapeutic strategy. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 143(11), 2189-2200.
- Li, D., Feng, J., Wu, T., Wang, Y., Sun, Y., Ren, J., YLiu, M. (2013). Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *The American journal of pathology*, 182(1), 64-70.
- Liu, X. H., Liu, Z. L., Sun, M., Liu, J., Wang, Z. X., & De, W. (2013). The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*, 13(1), 464.
- Lomnytska, M., Dubrovska, A., Hellman, U., Volodko, N., & Souchelnytskyi, S. (2006). Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *International journal of cancer*, 118(2), 412-421.
- Lu, L., Zhu, G., Zhang, C., Deng, Q., Katsaros, D., Mayne, S. T., *et al.* (2012) Association of large noncoding RNA HOTAIR expression and its downstream intergenic CpG island methylation with survival in breast cancer, *Breast Cancer Res Treat*, 136:875–883.
- Lujambio, A., Portela, A., Liz, J., Melo, S. A., Rossi, S., Spizzo, R., ...& Esteller, M. (2010). CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene*, 29(48), 6390.

- Lyng, H., Brøvig, R. S., Svendsrud, D. H., Holm, R., Kaalhus, O., Knutstad, K., ... & Stokke, T. (2006). Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC genomics*, 7(1), 268.
- Moran, V. A., Perera, R. J., Y Khalil, A. M. (2012). Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleicacidsresearch*, 40(14), 6391-6400.
- Narayan, G., Goparaju, C., Arias-Pulido, H., Kaufmann, A. M., Schneider, A., Dürst, M., ...Y Murty, V. V. (2006). Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Molecular cancer*, 5(1), 16.
- Nishida, N., Nishimura, T., Nakai, T., Chishina, H., Arizumi, T., Takita, M., ...& Minami, Y. (2014). Genome-wide profiling of DNA methylation and tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *DigestiveDiseases*, 32(6), 658-663.
- Oh, B. K., Kim, H., Park, H. J., Shim, Y. H., Choi, J., Park, C., Y Park, Y. N. (2007). DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *International journal of molecular medicine*, 20(1), 65-73.
- Piyathilake, C. J., Badiga, S., Borak, S. G., Weragoda, J., Bae, S., Matthews, R., ... Y Partridge, E. E. (2017). A higher degree of expression of DNA methyl transferase 1 in cervical cancer is associated with poor survival outcome. *International journal of women's health*, 9, 413.
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., Y Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629-641.
- Raddatz, G., Gao, Q., Bender, S., Jaenisch, R., & Lyko, F. (2012). Dnmt3a protects active chromosome domains against cancer-associated hypomethylation. *PLoS genetics*, 8(12), e1003146.
- Rauscher, G. H., Kresovich, J. K., Poulin, M., Yan, L., Macias, V., Mahmoud, A. M., ...& Ehrlich, M. (2015). Exploring DNA methylation changes in promoter, intragenic, and intergenic regions as early and late events in breast cancer formation. *BMC cancer*, 15(1), 816.
- Renard, C. A., Labalette, C., Armengol, C., Cougot, D., Wei, Y., Cairo, S., ... & Perret, C. (2007). Tbx3 is a downstream target of the Wnt/ β -catenin pathway and a critical mediator of β -catenin survival functions in liver cancer. *Cancer research*, 67(3), 901-910.
- Rodriguez, M., Aladowicz, E., Lanfrancone, L., & Goding, C. R. (2008). Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer research*, 68(19), 7872-7881.
- Rondelet, G., Y Wouters, J. (2017). Human DNA (cytosine-5)-methyltransferases: a functional and structural perspective for epigenetic cancer therapy. *Biochimie*, 139, 137-147.
- Rowley, M., Grothey, E., & Couch, F. J. (2004). The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 9(2), 109-118.

- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534), 321.
- Sharma S., Verma, S., y Kulshreshtha, R. (2013). The interplay of HuR and miR-3134 in regulation of AU rich transcriptome. *RNA Biology* 10:8, 1283–1290.
- Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., Y Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancerletters*, 339(2), 159-166.
- Sofer, T., Schifano, E. D., Hoppin, J. A., Hou, L., & Baccarelli, A. A. (2013). A-clustering: a novel method for the detection of co-regulated methylation regions, and regions associated with exposure. *Bioinformatics*, 29(22), 2884-2891.
- Su, C., Li, J., Cao, Y., Xiao, L., Y Shi, C. (2017). Long noncoding RNA HOTAIR promotes cisplatin resistance in gastric cancer through promoting WIF-1 promoter methylation. *Int J ClinExpMed*, 10(2), 2717-2726.
- Sun, J., Ji, J., Huo, G., Song, Q., & Zhang, X. (2015). miR-182 induces cervical cancer cell apoptosis through inhibiting the expression of DNMT3a. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(5), 4755.
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *NatureReviewsGenetics*, 9(6), 465.
- Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamarast, N., Wang, J. K., Lan, F., ... Y Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329(5992), 689-693.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A. et al., Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015 347(6220):1260419.
- Wang, C., Zhou, B., Liu, M., Liu, Y., YGao, R. (2017). miR-126-5p restoration promotes cell apoptosis in cervical cancer by targeting Bcl2l2. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25(4), 463-470.
- Williams, K. E., Anderton, D. L., Lee, M. P., Pentecost, B. T., & Arcaro, K. F. (2014). High-density array analysis of DNA methylation in tamoxifen-resistant breast cancer cell lines. *Epigenetics*, 9(2), 297-307.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D. D., Lay, F. D., Jones, P. A., & Liang, G. (2014). Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *CancerCell*, 26(4), 577-590.
- Yang, Y., Song, K. L., Chang, H., Y Chen, L. (2014). Decreased expression of microRNA-126 is associated with poor prognosis in patients with cervical cancer. *Diagnosticpathology*, 9(1), 220.
- Zhang, Y., Chen, F. Q., Sun, Y. H., Zhou, S. Y., Li, T. Y., & Chen, R. (2011). Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 98.
- Zhao, Y., Sun, H. Y Wang, H. (2016). Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell & Bioscience*, 6(1), 45.