



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

***“ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN DE VPH 16 INTEGRADO AL
GENOMA CELULAR”***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
PEDRO ROSENDO CHALMA

DIRECTORA DE TESIS: Dra. BERENICE ILLADES AGUIAR
CODIRECTOR DE TESIS: Dr. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2009.





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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de diciembre de dos mil ocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Análisis de metilación del ADN de VPH 16 integrado al genoma celular”, presentada por el alumno Pedro Rosendo Chalma, 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. Alejandro García Carrancá
Codirección de tesis


Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero


Dr. Pavel Sierra Martínez


Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño


Vo. Bo



Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas




Vo. Bo

Dr. Alfonso Bernabe Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer-UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología, México D.F. y en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo; Gro.

Bajo la dirección de la

Dra. Berenice Illades Aguiar

La codirección del

Dr. Alejandro García Carrancá

La asesoría de

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Pável Sierra Martínez

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento de CONACYT No. 6579/A-1 en el Instituto Nacional de Cancerología y con FOMIX CONACyT-Guerrero GUE-2002-C01-6523.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Pedro Rosendo Chalma recibió beca del CONACYT.

Se agradece al Banco Santander Serfin por otorgar la Beca de Movilidad Santander Universia durante el periodo de Agosto de 2008 a Diciembre de 2009.

- AGRADECIMIENTOS -

A Adonai Tz'va'ot. La fuente de todo lo que soy y lo que he de ser, mi Dios protector y proveedor. En él he aprendido que todas las cosas que parezcan imposibles son posibles para el que cree y lo declara así. *¡Baruj Ata Adonai Eloheinu Melej Ha-Olam!*

A la Dra. Berenice Illades Aguiar. Por toda su paciencia y apoyo durante el desarrollo de este proyecto, que en un principio fue complicado, pero que ahora ya es todo un hecho y un logro. Le agradezco también porque durante los seminarios de investigación nos enseñó a ser ordenados, a perderle el miedo a las circunstancias o a los fracasos que pudiéramos tener en nuestros experimentos, pero sobre todo a desarrollar nuestra capacidad de poder hacer varias cosas a la vez y comprometernos con todo lo que hacemos para cosechar buenos triunfos. Sus consejos me ayudaron a crecer profesionalmente y como persona, le agradezco mucho porque siempre ha estado ahí, en cualquier instante y momento.

Al Dr. Alejandro García Carrancá. Que muy amablemente me abrió las puertas de su laboratorio para culminar este proyecto, por todo su interés y aportaciones que fueron moldeando el proyecto. Le agradezco también por su disponibilidad y sus atenciones, no solo conmigo, sino con todos los que hemos tenido la fortuna de trabajar con usted.

Al M.C. Daniel Hernández Sotelo. Gracias por instruirme en este mundo de la epigenética y por su paciencia en mis momentos de delirio experimental, porque estuvo conmigo en esos momentos en donde ya no veía las cosas claras y siempre me invitaba a ser aun más perseverante y a buscar otras soluciones.

A la M.C. Jeiry Toribio Jiménez. Te agradezco muchísimo por todo tu apoyo y por que junto con Mary, Aby, Arleth y Gerardo me enseñaron a perder el miedo de trabajar de forma estratosférica y bien.

Al M.C. Noelio Zamudio López. Por su apoyo técnico y sus consejos para mejorar el análisis de secuencias que realizábamos en el laboratorio.

A la M.C. Roció Susana Méndez Martínez. Porque te toco hacer labor en enseñarme todo lo que iba a hacer. Gracias porque no solo estuviste al pendiente de proporcionarme y conseguirme todo el material que necesitaba sino porque también me ofreciste tu amistad.

A la Dra. Martha Martínez Salazar. Por tu disponibilidad, tu cátedra y porque hiciste que viera todo de la forma más amena posible, ha sido un gusto conocerte y tener tu amistad, pero sobre todo fue un gusto trabajar contigo y pasar por todos esos momentos en los que nos aventábamos jornadas maratónicas en nuestros experimentos y buscábamos las condiciones óptimas para que todo nuestro trabajo saliera excelente.

Un agradecimiento muy especial a la **Q.B.P. Natividad Sales Linares** y la **Q.B.P. Nelissa Rodríguez Dorantes** que muy amables me sumergieron en su mundo del procesamiento de muestras y en la Base de Datos del Banco de ADN del Laboratorio de Biomedicina.

A mis amigos y compañeros de generación de la Maestría. Yuliana, gracias porque junto con Rubén estaban ahí brindándome ánimos y porque fue ameno el ambiente mientras estuve con ustedes en el Laboratorio de Biomedicina, los quiero mucho. A Claudia, Ana Lilia, Olga, Irma, Blanca, Iris Paola, Diana, Dinorah, Alberto, Juan Pablo y Juan Antonio porque durante el transcurso de nuestra formación todos convivimos y pasamos por buenos momentos.

A mis compañeros en el Laboratorio de Virus y Cáncer en el INCan. José Luis y Samantha que me enseñaron la forma más rápida para analizar mis secuencias, gracias por el software. A la **M.C. Miriam Guido Jiménez** por su apoyo con las líneas celulares. A Anais, Jackie, Paty, Jorge gracias por su amistad y consejos. Raque muchas gracias también por mantener todo nuestro material siempre disponible.

- DEDICATORIAS -

Este trabajo se lo dedico a mis padres, el Sr. Pedro Eusebio Rosendo Hidalgo y la Sra. Rufina Chalma García. Este es un triunfo de ustedes, pues ustedes han cimentado y han sembrado en mí todas las buenas costumbres y los hábitos que me moldean. Muchas gracias porque han creído en mí y me han apoyado en todas las cosas que he emprendido. Los amo mucho y le agradezco a Dios de haber nacido y de haber crecido bajo sus cuidados, ustedes son mi orgullo y razón de ser.

A mis hermanos Arturo, Anaid y Santiago que amo bastante y llevo en mi corazón.

A mis pastores José e Irene González, César y Rita Minera por todas sus oraciones y porque me han enseñado a buscar la sabiduría y la ciencia como el tesoro más preciado que Dios nos ha dado, pero sobre todo a tomar y aprovechar las bendiciones que Dios me ha dado y a bendecir a todos los que me rodean.

Pedro Rosendo Chalma

ÍNDICE

C O N T E N I D O		P A G
I. Resumen		i
II. Abstract		ii
III. Introducción		01
IV. Material y métodos		05
IV.1 Material genético de biopsias de CaCU y citología normal		05
IV.2 Líneas celulares		05
IV.3 Plásmido psVPH 16		06
IV.4 Modificación del ADN viral y genómico con bisulfito de sodio		06
IV.5 Amplificación de los segmentos 5', central y 3' de la LCR de VPH 16 modificado con bisulfito de sodio.....		06
IV.6 Clonación de los productos amplificados		07
IV.7 Selección de clonas por PCR para secuenciación		08
IV.8 Secuenciación de los amplicones obtenidos de la LCR de VPH 16.		08
IV.9 Mapeo de CpGs metilados en la LCR de VPH 16		09
IV.10 Análisis estadístico		09
V. Resultados		10
V.1 Patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en el plásmido y líneas celulares		10
V.2 Patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en CaCU y citología normal		11
VI. Discusión y conclusión		15
VII. Referencias		18

I. RESUMEN

Antecedentes. La pérdida de la regulación de la expresión génica es una característica fundamental del cáncer, las modificaciones epigenéticas alteran la expresión genética y en consecuencia desempeñan un papel importante en la carcinogénesis. La integración del ADN viral en infecciones persistentes con tipos oncogénicos del Virus de Papiloma Humano (VPH) está asociada con la progresión de las lesiones precursoras a cáncer cérvicouterino (CaCU). La metilación en la región promotora del ADN del VPH se asocia con la inactivación transcripcional y la regulación de su expresión génica.

Objetivo. Determinar el patrón de metilación de la Región Larga de Control (LCR) en el ADN de VPH 16 integrado al genoma celular.

Material y métodos. Se analizaron cinco muestras de pacientes con CaCU y cuatro muestras con citología normal con ADN de VPH 16 integrado al genoma celular. La detección del VPH se realizó utilizando iniciadores para MY09/11 o GP5+/6+ y la tipificación se hizo mediante RFLPs o secuenciación. El estado físico viral se determinó por presencia o ausencia de un fragmento de 1027 pb para el gen E2, el cual se elimina durante la integración viral. Los sitios CpG metilados se detectaron por modificación del ADN con bisulfito de sodio, amplificación de las regiones virales: L1-5'LCR (*distal*), central (*enhancer*) y 3'LCR (*promotor*), clonación en TOPO TA y secuenciación.

Resultados. Los resultados indican que la metilación fue más frecuente en el *promotor* de la LCR en citologías normales y en la porción *distal* de la LCR en CaCU. El *enhancer* no está metilado en CaCU y en citología normal.

Conclusión. La integración del genoma viral en citología normal y CaCU no indujo una metilación homogénea en la LCR de VPH 16.

Palabras clave: Metilación del ADN, Región Larga de Control (LCR), VPH 16

II. ABSTRACT

Background. Loss of gene expression regulation is a key characteristic of cancer; epigenetic modifications alter gene expression and thus play an important role in carcinogenesis. Integration of viral DNA in persistent infections with oncogenic types of Human Papillomavirus (HPV) is associated with progression of precursors lesions to invasive uterine cervix cancer. The methylation in the promoter region of HPV DNA is associated with transcriptional inactivation and gene expression regulation.

Objective. To determine the methylation pattern in the Long Control Region (LCR) of HPV 16 integrated into the chromosomal DNA.

Materials and methods. We analyzed five samples from patients with uterine cervix cancer and four samples with normal cytology with integrated HPV 16 DNA into the chromosomal DNA. HPV detection was performed with MY09/11 or GP5+/ 6+ primers and typing with sequencing of PCR products or RFLPs. The viral physical estate was determined by the presence or absence of a fragment of 1027 bp from the E2 gene that is deleted during the viral integration. Methylated CpG sites were detected by modifying DNA with sodium bisulfite, amplification of the viral regions: L1-5'LCR (*distal*), central (*enhancer*) and 3'LCR (*promoter*), cloning with TOPO TA and sequencing.

Results. The results indicate the *promoter* region of the LCR is more frequently methylated in normal cytology and in the *distal* region in cancer. The *enhancer* is neither methylated in cancer and normal cytology.

Conclusion. Integration of the viral genome in normal cytology and cancer seems not to induce a homogeneous methylation of the LCR of HPV 16.

Keywords: DNA methylation, Long Control Region (LCR), HPV 16

III. INTRODUCCIÓN

La infección persistente con Virus de Papiloma Humano (VPH) de alto riesgo, tales como VPH 16 y 18, son un factor de importancia en la etiología de los cánceres anogenitales, específicamente en CaCU. Esta noción está basada en evidencias epidemiológicas que identifican un riesgo relativamente alto de progresión a cáncer asociada con la infección de VPHs de alto riesgo.

Con alrededor de 500,000 nuevos casos y 273,000 muertes cada año, el cáncer cérvicouterino contribuye significativamente a nivel mundial a la morbilidad y mortalidad relacionada a cáncer^{1,2}. Estudios han mostrado que las lesiones escamosas intraepiteliales de bajo grado (LEIBG) y las lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (LEIAG) presentan diferentes características genéticas y virales, que bajo ciertas circunstancias progresan a lesiones más severas y a CaCU^{3,4}. La mayoría de las lesiones asociadas a VPH regresan espontáneamente, indicando que alteraciones genómicas adicionales son necesarias para la progresión a cáncer⁴⁻⁷.

Se ha sugerido que la integración de VPH 16 al genoma de la célula huésped es un paso asociado con la progresión neoplásica⁸. Estudios *in vitro* con líneas celulares han demostrado que las células del epitelio cérvicouterino con VPH 16 integrado poseen una ventaja selectiva de crecimiento comparada con aquellas células que mantienen genomas de VPH 16 como episomas⁹⁻¹¹. En general, la frecuencia de la integración viral de VPH 16 incrementa de forma paralela con la evolución de las lesiones cervicales^{3,12}. Estudios han sugerido que la integración viral puede representar un riesgo de progresión a tumor, ya que este fenómeno ocurre muy frecuentemente en la región E2, la cual da lugar a la expresión descontrolada de E6 y E7, aunque en otros casos la integración puede darse en la región E1^{3,13,14}. Aunado a esto, se ha observado que los mecanismos epigenéticos que influyen en la conformación de la cromatina favoreciendo o reprimiendo la expresión de genes, pueden jugar un papel principal en la modulación transcripcional de VPH¹⁵⁻¹⁸. Uno de estos mecanismos que afectan la conformación de la cromatina es la metilación del ADN, específicamente la ocurrida en los dinucleótidos Citosina-Guanina (CpG)¹⁹⁻²¹.

Los dinucleótidos CpG metilados (meCpG) son sitios de unión de represores tales como MeCP2, que alteran la conformación del nucleosoma a través de su interacción con desacetilasas de histonas (HDACs) de manera que no favorecen la transcripción^{20,22-27}.

Evidencias recientes sugieren que los genomas de VPH 16 y 18 se pueden metilar pero aparentemente en diferentes patrones y en un contexto patológico diferente^{15,17,28-30}. Varios estudios se han enfocado en el patrón de metilación de la región larga de control (LCR) de VPH 16, ya que en este segmento se encuentran cuatro sitios de unión para la proteína E2 conocidos como E2SB, los cuales son de suma importancia para la regulación de la transcripción de los genes virales durante su ciclo de vida³¹⁻³⁴. El hecho de que E2 se una a sus sitios E2SB bloquea la unión de factores de transcripción, específicamente al promotor p97, de esta manera se regula la transcripción de E6 y E7³¹.

La LCR en base a sus funciones se divide en tres segmentos (Figura 1) y posee 16 sitios CpG²⁹, el primer segmento es el 5' o *distal*, con un contenido extraordinariamente alto de A+T (por arriba del 85%), contiene también un elemento regulador negativo que actúa para nivelar la estabilidad del ARN mensajero y una región de unión a matriz nuclear que reprime la expresión de proteínas; el segmento central o *enhancer* parece funcionar como un aumentador transcripcional específico, por último, el segmento 3' o *promotor* contiene el origen de replicación y el promotor de E6 y E7, denominado p97^{13,33,35-37}.

Se ha mostrado que múltiples factores de transcripción celular se unen *in vitro* a más de 20 sitios dentro de la LCR (Figura 1), tales como AP-1, NF-1, Oct-1, TFIID, Sp1, MSPF, GR y TEF-1 que modulan positivamente la transcripción^{35,36,38-41}, además de YY1 y E2 que la modulan negativamente^{12,22,42-44}. Los hallazgos de metilación en esta región indican que la LCR se encuentra metilada en especímenes con citología normal, que la metilación disminuye en LEIBG y se observa una hipermetilación en LEIAG y CaCU, estos hallazgos parecen indicar que los diferentes estados de metilación en los diferentes grados de lesión están dados por el estado físico del virus^{3,15,17,29,30,34,45}, ya que según la historia evolutiva de las lesiones en las infecciones iniciales del epitelio cérvicouterino y en las LEIBG el genoma viral se

encuentra en estado episomal y el hecho de que los genomas virales se integren al genoma celular es lo que propicia a una evolución más rápida de una LEIAG a CaCU^{7,9,11,13,29}. Sin embargo, en estos estudios donde se determinó el patrón de metilación de la LCR no se logró comprobar el estado físico viral.

Kim *et al.*, formularon una hipótesis al respecto, en donde indicaron que la metilación de CpGs representa en el genoma de los vertebrados un mecanismo de defensa contra ADN foráneo³⁰. Entonces, pareciera que el VPH tiende a utilizar esta maquinaria para regular su transcripción cuando éste se encuentra en estado episomal, y que esta situación cambia cuando ocurre el “suicidio” de su ciclo de vida en la integración.

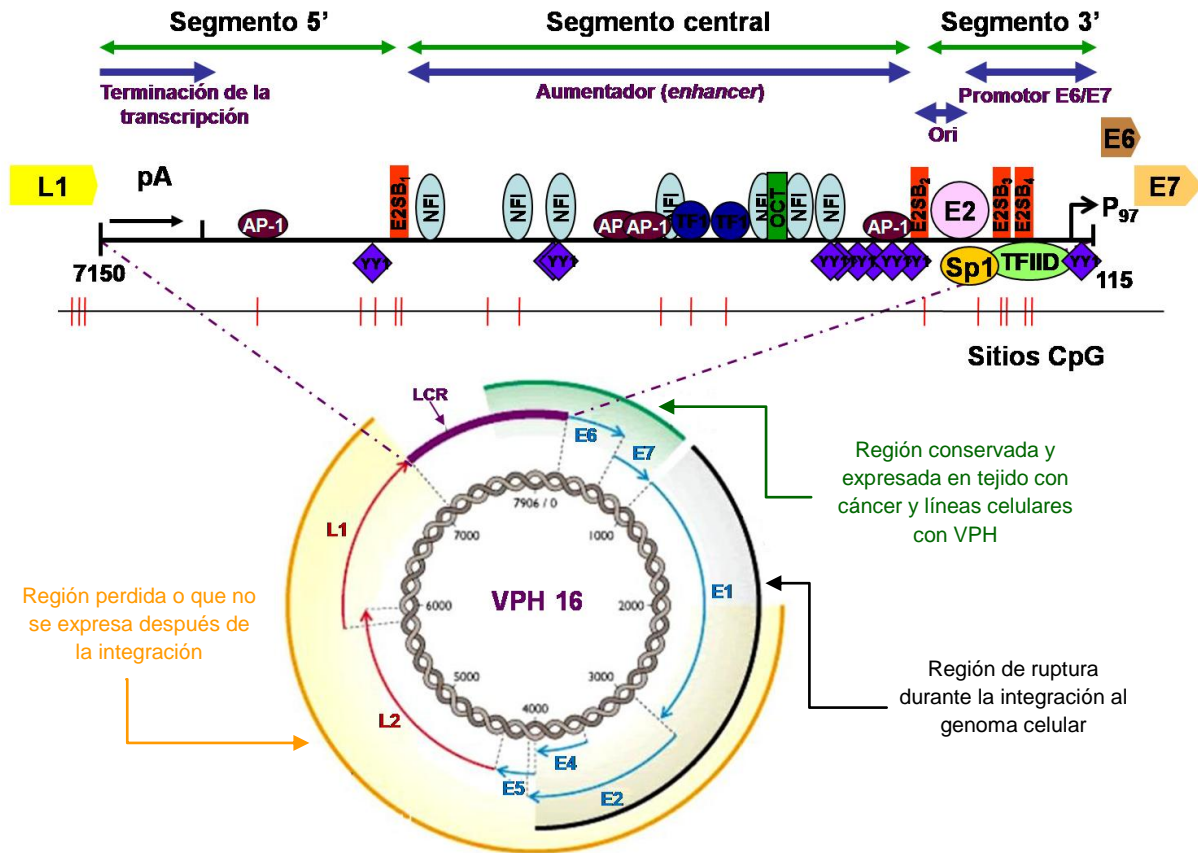


Figura 1. Mapa genómico del VPH 16. En la parte inferior se ilustra el genoma viral que está dividido en tres regiones de mando: la región temprana E (en azul), la región tardía L (en rojo) y una región larga de control no codificante (LCR en púrpura)⁴⁶. En la parte superior se ilustra la LCR, los factores de transcripción que se unen a esta región y la ubicación de 19 sitios CpG (líneas verticales rojas)^{32,35,38}.

No obstante, no se conoce el patrón de metilación de la LCR del ADN de VPH 16 que está integrado al genoma celular de especímenes con citología normal, lesiones precursoras y CaCU. Por tanto el objetivo de este trabajo fue determinar el patrón de metilación de la LCR en el ADN de VPH 16 integrado al genoma celular en especímenes con citología normal y CaCU. Estos resultados permitirán saber si la metilación juega un papel importante en la carcinogénesis y si éste patrón de metilación es homogéneo en CaCU como en citología normal y compararlo con los patrones de metilación anteriormente reportados.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 Material genético de biopsias de CaCU y citología normal

Del Banco de ADN del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, se seleccionaron 5 muestras de cáncer cérvicouterino y 4 con citología normal con VPH 16 integrado al genoma celular. Las características de la población seleccionada se muestran en el cuadro 1. La presencia de VPH 16 fue determinada por MY09/11-RFLPs o GP5+/6+ y secuenciación. La integración de VPH fue comprobada por la no detección de un producto de 1027 pb para el gen E2 utilizando los oligonucleótidos E2/II⁴⁷.

Cuadro 1. Características de las muestras de cáncer cérvicouterino y citología normal									
	MUESTRAS DE CaCU					MUESTRAS DE CITOLOGÍA NORMAL			
	CC06	CC36	CC41	CC45	CC76	CC65	CQ122	CQ1476	TH384
Tipo viral	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Estado físico	INT	INT	INT	INT	INT	INT	INT	INT	INT
Variante	E-G185G	E-350G	AA-a	E-350G	AA-a	-	-	-	-
Edad de la paciente (años)	73	50	63	44	82	53	37	49	20
Menarca (años)	14	15	15	12	15	13	15	13	15
Edad de inicio de menopausia (años)	40	49	46	43	50	51	S/E	48	S/E
Edad de inicio de vida sexual (años)	13	18	24	14	22	17	28	18	18
Número de compañeros sexuales	12	1	-	3	1	-	-	-	-
Gestas	10	9	12	5	7	10	2	3	1
Diagnostico histopatológico	CaCE	CaCE	CaCE	CaCE	ACa	-	-	-	-
Clasificación FIGO	IV A	I B	III B	I B	III A	-	-	-	-

(INT) Integrado; (-) No se tiene el dato; (S/E) Sin etapa; (CaCE) Carcinoma celular escamoso; (ACa) Adenocarcinoma

IV.2 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares SiHa y CaSki que fueron proporcionadas en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Cancerología. La extracción del ADN de las líneas celulares se realizó con el kit de extracción de ADN de QIAGEN.

SiHa y CaSki son líneas celulares de CaCU. En SiHa, hay de una a dos copias del genoma de VPH 16 que están integradas en E2 (ruptura en las posiciones 3132 y

3384), con una pérdida de 251 nucleótidos de la secuencia viral y 7.8 kb de ADN celular flanqueando al sitio de recombinación^{48,49}. Las células CaSki contienen 500 copias de ADN de VPH 16 integrado en numerosos *loci*, la mayoría está transcripcionalmente silenciado, posiblemente debido a un mecanismo de represión epigenética⁴⁸⁻⁵⁰.

IV.3 Plásmido psVPH-16

El plásmido psVPH-16 (proporcionado en el Laboratorio de Virus y Cáncer) se utilizó como control negativo de metilación del ADN del VPH. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* DH5 α y el ADN plasmídico se extrajo a través de la técnica de Minipreps por lisis alcalina⁵¹. Se comprobó la integridad de la región LCR de VPH 16 por restricción con la enzima *Pst*I. El plásmido fue linearizado con la enzima *Sa*II y se purificó utilizando el kit de purificación de ADN de Promega.

IV.4 Modificación del ADN viral y genómico con bisulfito de sodio

Se comprobó la integridad del ADN realizando una PCR para el gen de la β -globina. Se sometieron a modificación 60 ng del plásmido psVPH-16 y 1000 ng del ADN de muestras clínicas y de las líneas celulares SiHa y CaSki utilizando el kit para metilación del ADN EZ de Zymo Research.

IV.5 Amplificación de los segmentos 5', central y 3' de la LCR de VPH 16 modificado con bisulfito de sodio

Al ADN modificado se le realizó una PCR para los segmentos 5', central y 3' de la LCR de VPH 16 con los iniciadores reportados por Kalantari¹⁵, los cuales fueron diseñados teniendo en cuenta que el bisulfito además de modificar el ADN no metilado produce rupturas en el ADN, por tanto, resulta imposible amplificar con mucha eficiencia por PCR extensas regiones de ADN que excedan algunos cientos de pares de bases. Debido a esta limitante, el diseño de los oligonucleótidos se fraccionó para amplificar los tres segmentos de la LCR.

El segmento 5' o *distal* de la LCR se amplificó con los iniciadores: 16msp3F (posiciones 7050 a 7079; AAGTAGGATTGAAGGTTAAATTAATTA) y 16msp3R

(posiciones 7562 a 7591; AACAAACAATACAAATCAAAAAACAAAA) obteniéndose un producto de 542 pb; para el segmento central o potenciador (*enhancer*) de la LCR se utilizaron los iniciadores: 16msp4F (posiciones 7467 a 7494; TATGTTTTTTGGTATAAAATGTGTTTTT) y 16msp7R (posiciones 7705 a 7734; TAAATTAATTAACAAACCAAAAATATAT) obteniéndose un producto de 268 pb; y para amplificar el segmento 3' o *promotor* de la LCR se utilizaron los iniciadores: 16msp5F (posiciones 7750 a 7779; TAAGGTTTAAATTTTAAAGGTTAATTAAAT) y 16msp8R (posiciones 86 a 115; ATCCTAAAACATTACAATTCTCTTTTAATA) obteniéndose un producto de 272 pb¹⁵. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL que contiene 0.2 mM de dNTPs, 10 pmol de iniciadores, 1 mM de MgCl₂ y 1 U de AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer). La PCR se inició a 94° C por 9 minutos, seguida por una amplificación de 44 ciclos (desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 53° C por 30 segundos y una extensión a 68° C por 45 segundos) con una extensión final a 68° C por 7 min. Se verificó la presencia de producto por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

IV.6 Clonación de los productos amplificados

Los productos de PCR se clonaron utilizando el kit comercial de clonación para secuenciación TOPO TA de Invitrogen, el cual contiene el vector linearizado con extremos cohesivos en el cual sobresale un aditamento de poli-T unidos covalentemente a una topoisomerasa que cataliza la reacción de ligación del producto de PCR en forma eficiente y rápida al vector debido a que éste contiene extremos poliadenilados.

La reacción de clonación se realizó como sigue: en un tubo se colocaron 2 µL de agua estéril, 1 µL de salt, 1 µL del Vector TOPO, 2 µL de producto de PCR fresco (el producto de PCR puede ser viable hasta 7 días almacenado a -20° C), la reacción se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente y se agregó en un tubo eppendorf que contenía 25 µL de células competentes DH5α, la mezcla se incubó 30 minutos en hielo, se dio un choque térmico a 42° C por 40 segundos y se volvió a incubar en hielo por 2 minutos. Se adicionaron 100 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se incubó en un agitador a 37° C a 275 rpm por 60 minutos. Después de

la incubación se plaquearon 90 μ L del cultivo en cajas Petri con medio LB con kanamicina (50 μ g/mL) y se incubaron por 18 horas a 37° C.

IV.7 Selección de clonas por PCR para secuenciación

Con el fin de obtener datos representativos de la frecuencia de metilación de los sitios CpG de la LCR, se seleccionaron colonias de forma aleatoria para la PCR, la cual se llevó a cabo en un volumen de 25 μ L 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 10 clonas para cada segmento amplificado, los cuales fueron purificados usando *SAP* (Shrimp Alkaline Phosphatase) y *ExoI* (Exonuclease I) de la compañía USB. En un tubo se agregó 9.5 μ L del producto de PCR de colonia, 1 μ L del buffer 10X *SAP*, 1 μ L de *SAP* y 0.5 μ L de *ExoI*. 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° C⁵².

IV.8 Secuenciación de los amplicones obtenidos de la LCR de VPH 16

Los productos purificados se sometieron a reacción de secuenciación con el kit comercial ABI Prism Big Dye terminator cycle sequencing v3.1. La reacción consistió en 2 μ L del buffer de reacción 5X, 2 μ L del oligonucleótido M13F a 5 pMol/ μ L, 1.5 μ L de Big Dye terminator, 2 μ L de agua estéril y 2.5 μ L de producto amplificado y purificado con *Exo-SAP*. La reacción se sometió a un paso de desnaturalización inicial de 94° C por 3 minutos, seguido de 24 ciclos de 96° C por 30 segundos, 50° C por 15 segundos y 60° C por 4 minutos.

Para purificar los productos de PCR de los componentes de la reacción de PCR de secuencia, se precipitó en una mezcla que contenía 3 μ L de acetato de sodio 3M (pH 4.6), 32.5 μ L de Etanol desnaturalizado al 95% y 14.5 de agua, se

mezcló y agitó en vortex por unos segundos y se dejó precipitar toda la noche en frío (a -20° C). La mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 minutos a 4° C, se eliminó el sobrenadante, se hizo otro lavado con 250 µL de etanol al 70% y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm a 4° C, se eliminó el sobrenadante y se secó el ADN en una centrífuga de vacío Eppendorf. Por último, el botón de ADN se resuspendió en 20 µL de formamida Hi-Di y la reacción de secuencia se analizó en el Secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

IV.9 Mapeo de CpGs metilados en la LCR de VPH 16

Las secuencias y sus respectivos cromatogramas se analizaron con los softwares Chromas versión 2.31 y Lasergene versión 7.0. La secuencia de referencia utilizada fue la de VPH-16R de 7906 pb publicada en *Los Álamos National Laboratory*⁴⁶, en donde se convirtieron todas las citosinas a timinas a excepción de los sitios CpGs que se consideraron como metilados (meCpGs), por comparación de secuencia es como se detectaron los sitios CpGs.

IV.10 Análisis estadístico

Se determinaron frecuencias relativas de metilación para cada sitio CpG, para los segmentos 5', central y 3' de la LCR tanto en las muestras de CaCU como en las muestras con citología normal.

V. RESULTADOS

V.1 Patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en el plásmido y líneas celulares.

Se incluyeron controles negativos y positivos de metilación de la LCR. El plásmido psVPH-16 que fue producido en células competentes de *E. coli* DH5 α no posee CpGs metiladas (meCpG), por lo que se utilizó como control para probar la eficiencia de modificación del ADN con bisulfito de sodio y como control negativo de metilación, ya que las células de mamíferos poseen esta maquinaria de metilación y no las bacterias^{20,21,53}. Se incluyó también como control negativo de metilación a la línea celular SiHa, de la cual Badal *et al.* reportaron que está desmetilada en el *enhancer* y *promotor*²⁹. Por otro lado, CaSki fue incluida como control positivo de metilación, ya que según los reportes, el *enhancer* y *promotor* están hipermetilados^{15,29}.

Para el plásmido psVPH-16 y las líneas celulares SiHa y CaSki se determinó el patrón de metilación de un total de 95 sitios CpGs que se localizan en una porción de la región L1 (nucleótidos 7050-7156) y la LCR de VPH 16 (nucleótidos 7150-115). En psVPH-16 se observó que ningún sitio CpG está metilado (cuadro 2), indicando que la modificación con bisulfito fue eficiente ya que la presencia de un meCpG indicaría que no fueron correctamente desaminadas todas las citosinas no metiladas.

En el cuadro 2 se muestra que SiHa está desmetilada en la porción *distal*, en el *enhancer* y *promotor* de la LCR, mientras que la región estudiada de L1 está metilada. CaSki, por otro lado, está hipermetilada en la LCR, con un patrón de metilación heterogéneo en las posiciones 7091, 7136, 7145, 7535, 7554 y 7862, sin embargo, se observa que los sitios 7428, 7434, 7455, 7461, 7683, 7695, 31, 37, 43, 52 y 58 están siempre metilados, en cambio el sitio CpG 7270 no está metilado.

En la figura 2a se muestra un cromatograma en el que se hace una comparación entre la secuencia consenso del GenBank⁴⁶ y la secuencia de ADN que fue modificado con bisulfito. En la figura 2b se muestra como se realizó el alineamiento de secuencias en el software Lasergene v7.0.

una mayor metilación en la porción *distal* de la LCR y en L1; el *enhancer* y el *promotor* están hipometilados, sin embargo, es notorio que la biopsia CC41 está más metilada que CC76, ambas con la misma variante viral pero estadio de carcinoma diferente; mientras tanto, la biopsia CC36 y CC45 tienen el mismo estadio de carcinoma, la misma variante viral y presentan un patrón de metilación un tanto similar, aunque cabe señalar que el origen tumoral es diferente, CC36 es un carcinoma celular escamoso (CaCE) y CC45 es un adenocarcinoma (ACa).

Cuadro 3. Patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en muestras de cáncer cérvicouterino

	L1			LCR 5' (DISTAL)					LCR CENTRAL (ENHANCER)					LCR 3' (PROMOTOR)					
	7091 CpG	7136 CpG	7145 CpG	7270 CpG	7428 CpG	7434 CpG	7455 CpG	7461 CpG	7535 CpG	7554 CpG	7677 CpG	7683 CpG	7695 CpG	7862 CpG	31 CpG	37 CpG	43 CpG	52 CpG	58 CpG
CC06[†]; E-G185G[‡]																			
IV A*																			
CC36[†]; E-350G[‡]																			
I B*																			
CC41[†]; AA-a[‡]																			
III B*																			
CC45[†]; E-350G[‡]																			
I B*																			
CC76[†]; AA-a[‡]																			
III A*																			

† Clave de la muestra; ‡ Variante; *Clasificación del tumor en base a la FIGO
 NOTA: Un cuadro negro indica un CpG metilado, un cuadro blanco indica que no está metilado.

En el cuadro 4 se ilustra el patrón de metilación en las muestras de citología normal, que debido a la limitante en cuanto a la cantidad de ADN extraído en un raspado de células cervicales y al poco número de copias virales que pudieran encontrarse en una infección inicial del epitelio cérvicouterino, no contamos con

suficiente ADN para tener el patrón de metilación completo para L1 y la porción *distal* de la LCR en todas las muestras, sin embargo, en la que logramos procesar observamos que está hipometilada; el *enhancer* no está metilado en todos los especímenes. En cambio, se observa un patrón de metilación característico en los sitios 31, 43 y 58, estos sitios metilados se ubican en el sitio de unión para la proteína E2 (E2BS) la cual regula la transcripción viral, sin embargo, la metilación de estos sitios puede evitar también la unión de factores de transcripción celular.

Cuadro 4. Patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en citología normal

	L1			LCR 5' (DISTAL)					LCR CENTRAL (ENHANCER)					LCR 3' (PROMOTOR)					
	7091 CpG	7136 CpG	7145 CpG	7270 CpG	7428 CpG	7434 CpG	7455 CpG	7461 CpG	7535 CpG	7554 CpG	7677 CpG	7683 CpG	7695 CpG	7862 CpG	31 CpG	37 CpG	43 CpG	52 CpG	58 CpG
CQ65†																			
CQ122†																			
CQ1476†																			
TH384†																			

† Clave de la muestra
 NOTA: Un cuadro negro indica un CpG metilado, un cuadro blanco indica que no está metilado.

En la figura 3 se muestra la frecuencia relativa de metilación de los 19 sitios CpG analizados, la porción L1 está metilada en un 40.7% en CaCU y en un 3.3% en citología normal, la porción *distal* de la LCR está metilada en un 22% en CaCU y en un 2% en citología normal; el *enhancer* está metilado en un 1.2% en CaCU y 0% en citología normal, y el *promotor* está metilado en un 7% en CaCU y un 37.5% en citología normal.

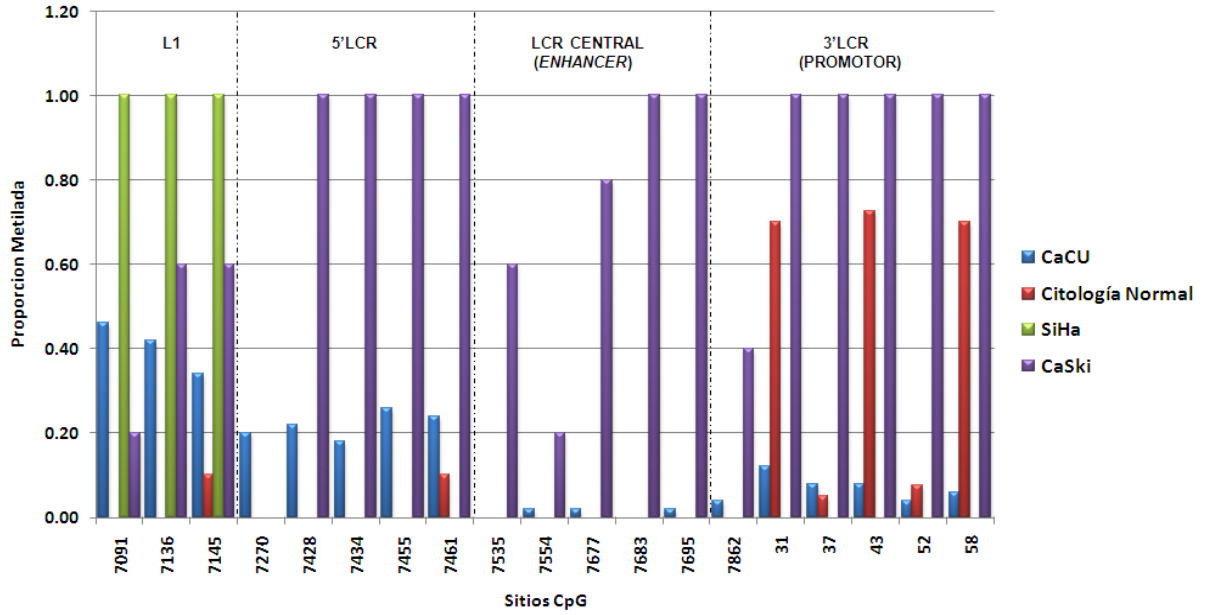


Figura 3. Frecuencia de metilación de 19 sitios CpG en el genoma de VPH 16. La frecuencia de metilación se determinó en el caso de las líneas celulares SiHa y CaSki de cinco clonas diferentes para los segmentos L1/*distal*, *enhancer* y *promotor*, para el caso de las muestras de cáncer cérvicouterino y citología normal la frecuencia de metilación se determinó de 10 clonas diferentes para los segmentos L1/*distal*, *enhancer* y *promotor* de la LCR.

VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó el patrón de metilación de la LCR (865 pb) y parte del gen L1 (107 pb) del ADN de VPH 16 en muestras de CaCU, de citología normal, del plásmido que contiene VPH 16 y de las líneas celulares SiHa y CaSki.

Los resultados obtenidos en las líneas celulares SiHa y CaSki fueron similares a lo reportado en el *enhancer* y *promotor* de la LCR en estudios previos^{15,29}. Nuestros resultados muestran que SiHa está completamente desmetilada en la LCR y metilada en L1, por otro lado, CaSki muestra un patrón de metilación heterogéneo en la LCR y L1, lo que nos puede sugerir, que estas diferencias en cuanto al patrón de metilación pueden deberse al número de copias virales que se integraron al genoma celular, el cual es mayor en CaSki (500 copias) que en SiHa (1-2 copias). Por otro lado surge la interrogante de cómo se expresan los oncogenes a partir de una LCR metilada en el caso de CaSki y de una LCR no metilada en el caso de SiHa. Es conocido que la continua expresión de E6 y E7 son necesarias para la progresión maligna y para el mantenimiento del fenotipo transformado y que durante el ciclo de vida de VPH 16 la unión de E2 a los E2BS impide la unión de factores de transcripción, de esta forma se regula la transcripción de las oncoproteínas, sin embargo al interrumpirse el ciclo de vida en la integración viral, E2 se pierde, por tanto, se favorece la expresión de las oncoproteínas E6 y E7^{31,34}. En el caso de SiHa, observamos que la LCR de VPH está desmetilada, por tanto la unión de los factores de transcripción AP-1, NF1, Oct-1, TFIID, MSPF y Sp1, favorecerán positivamente la expresión de los oncogenes^{44,54,55}, en cambio, la LCR de VPH en CaSki está casi totalmente silenciada por metilación, sin embargo, la expresión de los oncogenes puede darse a partir de dos vías, la primera es que procedan de un *loci* de integración diferente que no esté metilado²⁹, la segunda es debido al factor de transcripción Sp1, el cual tiene un sitio de reconocimiento GGCG, que incluye un sitio CpG³⁵. Sp1 tiene la característica de unirse a su secuencia blanco esté o no esté metilado el sitio CpG^{39,56}, el sitio de unión de Sp1 en la LCR cae justamente en la CpG 38, que como se observa en el cuadro 2, está totalmente metilado en CaSki y a pesar de estar silenciado, Sp1 pudiera estar involucrado en la expresión de los oncogenes. Adicionalmente, en la

LCR se encuentra un sitio de unión de activadores o potenciadores denominado MSPF (Methylation-Sensitive Papillomavirus Transcription Factor), los cuales se ubican entre las posiciones 7550-7556 y 7680-7686, la desmetilación de los sitios CpG 7554 y 7683 en el *enhancer* favorecería la unión de activadores, lo que potenciaría aún más la transcripción oncogénica^{57,58}.

Nosotros observamos que la LCR en las muestras de CaCU está metilada en un 9.9% a comparación del 18.6% en citología normal, lo que quiere decir que la metilación inducida por la integración del genoma viral en citología normal es mayor que en las de CaCU. También observamos que el *promotor* de la LCR está más metilado en citología normal que en CaCU, lo que sugiere que la desmetilación de este segmento beneficia la unión de factores de transcripción que favorecen la expresión de las oncoproteínas virales E6/E7.

Se ha reportado que la metilación del genoma del VPH puede ser el resultado de un mecanismo de defensa celular en contra de genomas foráneos, el cual se induce al momento en que el genoma viral ingresa a la célula y cuando se integra al genoma celular^{15,29,30,57}. A partir de estos antecedentes, nos planteamos la hipótesis de que si los genomas integrados del VPH son blancos de metilación eficiente, el patrón de metilación sería el mismo tanto en CaCU como en citología normal, sin embargo, al hacer el análisis de nuestros resultados encontramos patrones de metilación diferentes, la metilación fue más frecuente en el *promotor* de la LCR en citología normal y en la porción *distal* de la LCR en CaCU. La metilación del *promotor* en muestras de citología normal puede ser resultado de un mecanismo de defensa celular, como pudiera ser el caso de las muestras CQ65, CQ122 y TH384 (cuadro 4), sin embargo, la hipometilación del *promotor* como se observa en la muestra CQ1476, pudiera estar asociada con el inicio de una neoplasia al ser permisible la unión de factores de transcripción que favorecen la expresión de los oncogenes E6/E7. En los casos de CaCU, la hipometilación del *promotor* pudiera asociarse con el mantenimiento del fenotipo transformante, además es posible que la hipometilación de los sitios MSPF en el *enhancer* y la unión de factores de transcripción en el *promotor* potencien la transcripción de los oncogenes E6/E7. Las muestras CC36 y CC45 que provienen de un carcinoma celular escamoso tienen la misma variante

viral, el mismo estadio de carcinoma y no tienen metilado el *enhancer* y el *promotor*, esto parece indicar que este estado de metilación puede favorecer a la evolución del carcinoma celular escamoso a un estadio más severo, como sería el caso de la muestra CC06 que tiene un patrón de metilación similar pero con otra variante. Otro dato interesante se observa en las muestra CC41 que proviene de un carcinoma celular escamoso y la muestra CC76 que proviene de un adenocarcinoma, ambas muestras tienen la misma variante y están en el estadio III según la clasificación histopatológica, pero existe una mayor metilación en L1, la porción *distal* y *promotor* de la LCR en la muestra CC41 a diferencia de la muestra CC76, esto parece indicar que la variante AA-a indujo una mayor metilación en epitelio escamoso que en epitelio cilíndrico simple.

El número de muestras con las que se realizó este estudio, permitió obtener resultados que aportan una valiosa información ya que logramos determinar el patrón de metilación de la LCR de VPH 16 en muestras que tienen el virus integrado, disminuyendo las variaciones que pudieran existir en muestras donde el genoma viral estuviera en un estado episomal o coexistiera el estado episomal/integrado. El estudiar muestras con VPH integrado permitió coadyuvar a demostrar que la metilación de la LCR juega un papel muy importante en la regulación de la transcripción y la expresión genética del genoma viral. Para entender cómo el virus utiliza la maquinaria de metilación para desarrollar un fenotipo maligno cuando éste se integra desde la primera infección, sería interesante determinar el patrón de metilación de la LCR en lesiones de alto y bajo grado en las que además de determinar el estado físico viral por PCR para el gen E2, también se afine la técnica con la amplificación de ARN mensajeros para E2. También sería importante determinar las variantes y la carga viral que pudiera estar integrada al genoma celular y si el sitio de integración de alguna manera favorece o no la metilación de los genomas virales, de esta forma se podría considerar si se incluye como un marcador de progresión a CaCU.

En conclusión, la integración del genoma viral en CaCU y citología normal no indujo un patrón de metilación homogéneo en la LCR de VPH 16.

VII. REFERENCIAS

1. Cancer Research of United Kingdom. UK cancer incidence statistics for common cancers. Publication year 2008. [Accessed on November 06, 2008]; Hiperlink: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/commoncancers/>
2. Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Barros-Dios XM, Borrás J, *et al.* International trends in incidence of cervical cancer: II. Squamous-cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2000 May; 86(3):429-435.
3. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 May; 44(5):1755-1762.
4. Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, *et al.* TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Feb; 96(4):294-305.
5. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2002 Apr; 55(4):244-265.
6. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine*. 2006 Aug; 24 Suppl 3:S3/42-51.
7. Muñoz N, Castellsague X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006 Aug; 24 Suppl 3:S3/1-10.
8. Thorland EC, Myers SL, Persing DH, Sarkar G, McGovern RM, Gostout BS, *et al.* Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Research*. 2000 Nov; 60(21):5916-5921.
9. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*. 1995 May; 69(5):2989-2997.
10. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Feb; 92(5):1654-1658.
11. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Apr; 89(7):3159-3163.
12. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003 Jan; 16(1):1-17.
13. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*. 2004 Nov; 78(21):11451-11460.
14. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews*. 2007 Jan; 7(1):11-22.
15. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, *et al.* Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *Journal of Virology*. 2004 Dec; 78(23):12762-12772.
16. Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE, Bernard HU. Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *International Journal of Cancer*. 2008 Oct; 123(8):1832-1840.

17. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL, *et al.* Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology*. 2006 May; 349(1):175-183.
18. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology*. 2007 Apr; 361(1):185-193.
19. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*. 2000 Oct; 9(16):2395-2402.
20. Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2005 Oct; 15(5):490-495.
21. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000 Mar; 21(3):461-467.
22. Ballestar E, Wolffe AP. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 2001 Jan; 268(1):1-6.
23. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Human Molecular Genetics*. 2001 Apr; 10(7):687-692.
24. Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clinical Cancer Research*. 2001 Jul; 7(7):1982-1986.
25. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003 Feb; 278(6):4035-4040.
26. Imai K, Toyota M, Sato H, Shinomura Y. [DNA methylation and carcinogenesis]. *Nihon Naika Gakkai Zasshi*. 2006 Feb; 95(2):362-367.
27. Yoshikawa H. [DNA methylation and cancer]. *Gan to Kagaku Ryoho*. 2007 Feb; 34(2):145-149.
28. Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LS, Li BF, *et al.* The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology*. 2004 Jul; 324(2):483-492.
29. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, *et al.* CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of Virology*. 2003 Jun; 77(11):6227-6234.
30. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *Journal of Virology*. 2003 Dec; 77(23):12450-12459.
31. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology*. 2006 Oct; 354(2):280-285.
32. Carson A, Khan SA. Characterization of transcription factor binding to human papillomavirus type 16 DNA during cellular differentiation. *Journal of Virology*. 2006 May; 80(9):4356-4362.
33. Soeda E, Ferran MC, Baker CC, McBride AA. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. *Virology*. 2006 Jul; 351(1):29-41.
34. Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *Journal of Virology*. 1996 Oct; 70(10):7233-7235.
35. Gloss B, Bernard HU. The E6/E7 promoter of human papillomavirus type 16 is activated in the absence of E2 proteins by a sequence-aberrant Sp1 distal element. *Journal of Virology*. 1990 Nov; 64(11):5577-5584.

36. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papilloma virus-16 contains an E2 protein-independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *The EMBO Journal*. 1987 Dec; 6(12):3735-3743.
37. Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *The Journal of General Virology*. 2000 Dec; 81(Pt 12):2969-2982.
38. Chan WK, Chong T, Bernard HU, Klock G. Transcription of the transforming genes of the oncogenic human papillomavirus-16 is stimulated by tumor promoters through AP1 binding sites. *Nucleic Acids Research*. 1990 Feb; 18(4):763-769.
39. Höller M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes & Development*. 1988 Sep; 2(9):1127-1135.
40. Ishiji T, Lacey MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, *et al.* Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *The EMBO Journal*. 1992 Jun; 11(6):2271-2281.
41. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American Journal of Pathology*. 1985 Jun; 119(3):361-366.
42. Kim J, Kollhoff A, Bergmann A, Stubbs L. Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Human Molecular Genetics*. 2003 Feb; 12(3):233-245.
43. O'Connor MJ, Stunkel W, Koh CH, Zimmermann H, Bernard HU. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses through a conserved silencing element. *Journal of Virology*. 2000 Jan; 74(1):401-410.
44. O'Connor MJ, Stunkel W, Zimmermann H, Koh CH, Bernard HU. A novel YY1-independent silencer represses the activity of the human papillomavirus type 16 enhancer. *Journal of Virology*. 1998 Dec; 72(12):10083-10092.
45. Kalantari M, Lee D, Calleja-Macias IE, Lambert PF, Bernard HU. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology*. 2008 May; 374(2):292-303.
46. Los Alamos National Laboratory. Human papillomavirus type 16 (HPV16), complete genome. Publication year 1991. [Accessed on April 07, 2008]; Hiperlink: <http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>
47. Park JS, Hwang ES, Park SN, Ahn HK, Um SJ, Kim CJ, *et al.* Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. *Gynecologic Oncology*. 1997 Apr; 65(1):121-129.
48. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Journal of Virology*. 1987 Apr; 61(4):962-971.
49. Bauer-Hofmann R, Borghouts C, Auvinen E, Bourda E, Rosl F, Alonso A. Genomic cloning and characterization of the nonoccupied allele corresponding to the integration site of human papillomavirus type 16 DNA in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology*. 1996 Mar; 217(1):33-41.

50. Van Tine BA, Knops J, Broker TR, Chow LT, Moen PT, Jr. In situ analysis of the transcriptional activity of integrated viral DNA using tyramide-FISH. *Developments in Biologicals*. 2001; 106:381-385.
51. Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smit JA, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. 1994, United States of America. Editorial Board.
52. Werle E, Schneider C, Renner M, Volker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*. 1994 Oct; 22(20):4354-4355.
53. Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 2002 Oct; 269(20):4981-4984.
54. Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor MJ, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 repress or activate the E6 promoter, depending on the physical state of the viral DNA. *Journal of Virology*. 2000 Mar; 74(6):2489-2501.
55. Tan SH, Bartsch D, Schwarz E, Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *Journal of Virology*. 1998 May; 72(5):3610-3622.
56. Harrington MA, Jones PA, Imagawa M, Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Apr; 85(7):2066-2070.
57. Hong D, Lu W, Hu Y, Wan X, Chen Y, Xie X. Methylation status of the long control region of HPV 16 in clinical cervical specimens. *Molecular Medicine Reports*. 2008; 1:555-560.
58. List HJ, Patzel V, Zeidler U, Schopen A, Ruhl G, Stollwerk J, *et al.* Methylation sensitivity of the enhancer from the human papillomavirus type 16. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994 Apr; 269(16):11902-11911.