



**UAGro**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**



**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Metilación del gen L1 e integración de VPH-AR en citología normal, lesiones precancerosas y CaCU y efecto de E6 en la metilación de genes relacionados a cáncer**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Biomédicas**

**P R E S E N T A:**

**Francisco Israel Torres Rojas**

**Directora de tesis:**

**Dra. Berenice IlladesAguar**

**Codirectora de tesis:**

**Dra. Dinorah Leyva Illades**

Chilpancingo, Guerrero, enero 2017.

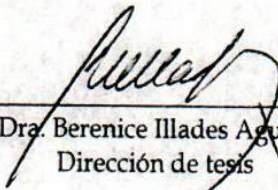


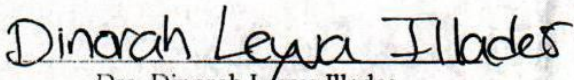
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

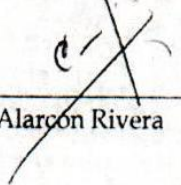
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

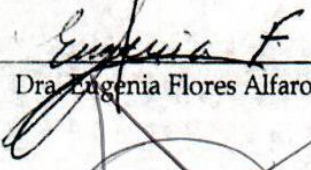
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de enero del dos mil dieciséis, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada **"Metilación del gen L1 e integración de VPH-AR en citología normal, lesiones precancerosas y CaCU y efecto de E6 en la metilación de genes relacionados a cáncer"**, presentada por el alumno Francisco Israel Torres Rojas, para obtener el Grado de Doctor 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.

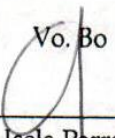
El Comité Tutorial

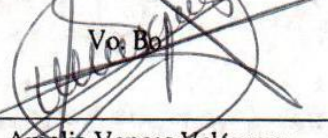
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Berenice Illades Aguiar  
Dirección de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Dinorah Leyva Illades  
Codirección de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Luz del Carmen Alarcón Rivera

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Eugenia Flores Alfaro

  
\_\_\_\_\_  
Vo. Bo  
Dra. Isela Parra Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Unidad  
Académica de Ciencias Químico Biológicas

  
\_\_\_\_\_  
Vo. Bo  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Unidad Académica de Ciencias  
Químico Biológicas



Metilación del gen L1 e integración de VPH-AR en citología normal, lesiones precancerosas y CaCU y efecto de E6 en la metilación de genes relacionados a cáncer

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

La Codirección de:

Dra. Dinorah Leyva Illades

Y con la asesoría de:

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Eugenia Flores Alfaro

Esta investigación se desarrolló como parte del proyecto “Diseño de un panel de biomarcadores para la detección temprana de cáncer cérvicouterino a partir de una sola toma de muestra” financiado por el CONACYT, con el número de clave 201579 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS), convocatoria 2013.

Durante el periodo en que cursó el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el C. Francisco Israel Torres Rojas fue becario **CONACYT**.

## **Metilación del gen L1 e integración de VPH-AR en citología normal, lesiones precancerosas y CaCU y efecto de E6 en la metilación de genes relacionados a cáncer**

### **ÍNDICE**

Resumen .....	5
Introducción.....	6
Capítulo I.....	10
Methylation of L1 gene and integration of HPV 16 and HPV 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions. ....	12
Capítulo II.....	366
La oncoproteína E6 de variantes del VPH-16 afecta la expresión de DNA metiltransferasas, pero no la metilación de genes supresores de tumor .....	367
Discusión .....	499
Referencias .....	533

## Resumen

**Introducción:** El cáncer cérvicouterino (CaCU) es la tercera neoplasia más común entre mujeres, cuyo agente causal es el virus de papiloma humano (VPH), los VPH 16 y 18 son asociados con mayor frecuencia a esta neoplasia maligna. La integración viral es un mecanismo trascendental en la transformación celular; para identificar la integración viral existen actualmente diferentes métodos, sin que se tenga hasta ahora un método confiable al 100%. Un papel determinante en el proceso carcinogénico es el papel que desempeñan las oncoproteínas virales, las cuales además de desregular el ciclo celular inhibiendo a proteínas importantes como p53 y pRb, están involucradas en alterar la expresión de componentes de la maquinaria epigenética celular, tales como las DNA metiltransferasas. **Objetivo:** Comparar la concordancia entre tres métodos para determinar integración de VPH-AR y evaluar el efecto que tiene la oncoproteína E6 de variantes de VPH 16 en la expresión de DNA metiltransferasas y metilación de genes celulares. **Métodos:** Se analizaron muestras exoendocervicales de 39 mujeres sin lesión escamosa intraepitelial (LEI) y de 102 con LEI de bajo grado (LEIBG), y biopsias de 13 mujeres con LEI de alto grado (LEIAG) y 33 con CaCU, a las que se les determinó el estado físico viral por hibridación *in situ* (HIS) con amplificación por tiramida, por la proporción E2/E6 utilizando qPCR y por metilación del gen L1 usando secuenciación posterior a PCR sensible a metilación para 12 sitios CpG en VPH 16 y 18 sitios en VPH 18. La concordancia entre los métodos fue realizada por el cálculo de porcentajes de concordancia positivos. Así también, se valoró la expresión de DNA metiltransferasas y metilación en genes supresores de tumor en células C33-A transfectadas con E6 de variantes de VPH 16. **Resultados:** Los porcentajes de concordancia fueron de 96.1% entre qPCR y la HIS, y de 76.7% entre la metilación en el gen L1 y qPCR. Se encontró mayor riesgo de desarrollar cáncer cuando se encuentran metilados los sitios 5617 y 5926 de VPH 16 (OR=42.5; IC95%: 4.7-1861 y OR=19.7; IC95%: 2.4-876, respectivamente). Se observó incremento en la metilación en L1 conforme progresa la lesión y que las variantes E6 del VPH16 modulan diferencialmente la expresión de DNA metiltransferasas. No se observó efecto en la metilación de los genes CDKN2A, CALCA, THBS1, VAV3 y RAR $\beta$ . **Conclusiones:** La metilación del gen L1 del VPH 16 incrementa conforme progresa la lesión. Existe metilación sitio específica para VPH 16 que se asocia con el desarrollo de cáncer. La HIS y, qPCR y metilación de L1 presentaron buena concordancia entre si. Se comprobó que las variantes de E6 del VPH 16 modulan diferencialmente la expresión de DNA metiltransferasas.

**Palabras clave:** HPV-AR, CaCU, integración viral, HIS, RT-qPCR, Metilación L1

## Introducción

El cáncer cérvicouterino (CaCU) es la tercera neoplasia más común entre mujeres de todo el mundo con un estimado de 527,624 nuevos casos y 265,653 muertes en 2008 (Ferlay et al., 2010). En México, del 2000 al 2006 se observó una disminución del 6% en la tasa de mortalidad anual por CaCU (Caro-Lozano y Zúñiga-Carrasco, 2009). En 2012, se detectaron 13,960 nuevos casos de CaCU y 4,769 murieron a causa de esta enfermedad (Calleja-Macias et al., 2004). En el estado de Guerrero, en el 2013, se reportó una tasa de mortalidad de 10.3 por cada 100,000 mujeres (<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/12950/MortalidadCaMa2000a2013.pdf> accesada el 22-05-2016).

El desarrollo del CaCU es un proceso multifactorial, en el cual están involucrados diferentes factores de riesgo como la edad, el inicio de relaciones sexuales antes de los 18 años, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual, múltiples parejas sexuales, tabaquismo, desnutrición, deficiencia de antioxidantes, inmunodeficiencia y el elemento más importante es la infección cervical con virus del papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) (Chavaro-Vicuña et al., 2009). El VPH es un virus de DNA de doble cadena que infecta células epiteliales de la piel y mucosas, es el agente causal del CaCU e infecciones anogenitales; además ha sido detectado en tumores extragenitales como oral, esófago, laringe y pulmón (Amarante and Watanabe, 2009). Los virus que infectan mucosa genital pueden ser divididos en VPH-AR, que incluyen a VPH16, 18, 31 entre otros, que están asociados al CaCU; y los VPH de bajo riesgo (VPH-BR) que incluyen al VPH6 y 11 que infectan el epitelio genital, pero en muy raras ocasiones son detectados en neoplasias (Bodily and Laimins, 2011).

Las diferencias en la secuencia genómica del VPH son útiles para definir tipos, subtipos y variantes. Si la diferencia es entre un 2 y 10% en relación a la secuencia genómica del VPH16 prototipo (NC\_001526.2), se considera como subtipo, si la diferencia es entre el 0 y 2% entonces se denomina variante (de Villiers et al., 2004). Datos moleculares y epidemiológicos sugieren que las variantes del mismo

tipo viral son biológicamente distintas y pueden conferir riesgos patogénicos diferenciales. También se ha visto que la distribución de estas variantes es diferente entre regiones geográficas y grupos étnicos del mundo, y se sugiere que las variantes del VPH 16 y de otros tipos de VPH coevolucionaron con los humanos, estimándose que su diversidad refleja una evolución de casi 200,000 años (Lizano et al., 2009, Schiffman et al., 2010, Yamada et al., 1995, Bernard et al., 2006). La propuesta de clasificación más reciente propone la existencia de 9 sublinajes (europea, asiática, africana 1a, africana 1b, africana 2a, africana 2b, norteamericana, asiático americana 1 y asiático americana 2), de acuerdo a la variabilidad en las regiones LCR y E6 (Cornet et al., 2012), aunque generalmente se acepta la clasificación de 5 variantes (africanas, europeas, asiáticas, asiático-americanas y norteamericanas). Las variantes de VPH16 que se encuentran con mayor frecuencia en nuestro país son la variante Europea y la Asiático-Americana (AA) (Calleja-Macias et al., 2004). En la variante AA, el gen E2 contiene una gran cantidad de cambios nucleotídicos, las células infectadas con esta variante presentan alta carga viral y retienen la región E1/E2; indicando que la integración viral no es un fenómeno exclusivamente necesario para la progresión a CaCU (Casas et al., 1999). Las variantes del VPH16 más frecuentes en lesiones precancerosas y CaCU en el estado de Guerrero coinciden con las del resto del país; un 82.12% en el caso de la Europea y un 17.58% para la AA (Ortiz-Ortiz et al., 2015).

Durante el proceso carcinogénico, un evento crucial es la integración del genoma de los VPH-AR al genoma hospedero (Jeon and Lambert, 1995, Romanczuk and Howley, 1992). La transformación cancerígena es mediada principalmente por las oncoproteínas E6 y E7. La acción más importante de E6 es inhibir la función de p53, esta oncoproteína es expresada de manera temprana durante la infección viral, cumpliendo diversas funciones que alteran la morfología e incrementan la vida celular activando la telomerasa y la transcripción de genes celulares a través de la interacción con p300/CBP, un coactivador de p53 (Ganguly and Parihar, 2009). La función más conocida de la proteína E7 es la degradación

de Rb vía proteosoma, lo que sucede previa interacción física entre Rb y E7 (Boyer et al., 1996).

La metilación del DNA es importante en la regulación transcripcional, remodelación de la cromatina, estabilidad genética, y generalmente se asocia con la represión genética (Bird, 2002). Esta marca epigenética es llevada a cabo por tres enzimas: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. DNMT1 se localiza en sitios de replicación del DNA durante la fase S y tiene un papel de mantenimiento de los patrones de metilación durante las divisiones celulares; DNMT3A y DNMT3B son las enzimas responsables para el establecimiento de los patrones de metilación durante el desarrollo embrionario y en células germinales (Jurkowska et al., 2011). La alteración en la metilación del DNA es un fenómeno recurrente durante el proceso de carcinogénesis (Baylin and Ohm, 2006).

Estudios previos han encontrado que la infección por VPH16 está relacionada con el incremento de la metilación en promotores de genes supresores de tumor, reparadores de DNA y reguladores del ciclo celular, lo que significaría una acumulación de alteraciones fisiológicas y en consecuencia el desarrollo de cáncer (Wentzensen et al., 2009; Leonard et al., 2012). Hay evidencia de que la infección por VPH-AR induce un incremento en la expresión de DNA metiltransferasas y altera los niveles de metilación global en queratinocitos humanos (Leonard et al., 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la oncoproteína viral E6 puede regular positivamente la expresión y actividad de DNMT1 (Au Yeung et al., 2010), interactuando también físicamente con metiltransferasas de histonas, generando así modificaciones epigenéticas en genes celulares (Hsu et al., 2012), como lo es el incremento de la metilación de sus respectivos promotores (Leonard et al., 2012).

El incremento de la metilación del gen L1 del VPH16 ha sido asociado con el progreso de lesiones precancerosas, por lo cual, se ha propuesto utilizar la detección de metilación en L1 como un marcador de progresión a cáncer (Oka et al., 2013). Además, se ha observado que existe una relación positiva de la metilación en L1 con la integración del virus (Kalantari et al., 2010), aunque dicha relación no ha podido ser claramente establecida por otros autores (Oka et al.,



2013). Una asociación entre la edad y la metilación del gen L1 ha sido establecida previamente y se ha sugerido que puede ser un marcador pronóstico de lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) o alto grado (LEIAG) (Mirabello et al., 2013). Entre las regiones del genoma viral con mayor incremento de metilación en lesiones de bajo y alto grado se ha localizado a L1 y L2, por lo cual se ha sugerido que el análisis de metilación en mencionadas regiones se utilice como un método diagnóstico (Lorincz et al., 2013).

En la actualidad no existe un marcador infalible de integración viral, por lo cual un objetivo de este estudio fue analizar sí la metilación en L1 del VPH16 puede ser útil como un marcador de integración viral, comparándola con la PCR en tiempo real cuantitativa y la hibridación *in situ* (HIS). Otro objetivo fue analizar la metilación del gene L1 en los diferentes grados de lesión cervical. También se evaluó el efecto de E6 en la expresión de DNA metiltransferasas y en la metilación de genes asociados a CaCU para valorar si las diferentes variantes E6 de VPH16 regulan de manera diferencial modificaciones epigenéticas en el DNA de las células C-33A. .

## **Capítulo I**

Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions.

**Correo de aceptación del artículo para publicación**

Oncology Letters  
5-6 King Street Cloisters, Clifton Walk, London W6 0GY, United Kingdom

January 11, 2017

MS No.: OL-12237-E175374

Title: Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions.  
By: Torres-Rojas et al.

Professor B Illades-Aguar

We are pleased to inform you that the above manuscript has been provisionally accepted for publication in Oncology Letters.

The manuscript will be sent for production shortly. Once production has been completed, the page proofs of the manuscript will be sent to you with minor revisions for your consideration. No further action is required on your part until the proofs have been prepared. The submission should be formally accepted upon the receipt of proofs

Please do not hesitate to contact us if you have any questions in the interim.

Yours sincerely,

Spandidos Publications

## **Title page**

### **Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions.**

Francisco Israel Torres-Rojas<sup>1</sup>, Luz del Carmen Alarcón-Romero<sup>2</sup>, Marco Antonio Leyva-Vázquez<sup>1</sup>, Julio Ortiz-Ortiz<sup>1</sup>, Miguel Ángel Mendoza-Catalán<sup>1</sup>, Daniel Hernández-Sotelo<sup>1</sup>, Oscar Del Moral-Hernández<sup>1</sup>, Hugo Alberto Rodríguez-Ruiz<sup>1</sup>, Dinorah Leyva-Illades<sup>1</sup>, Eugenia-Flores Alfaro<sup>1</sup>, Berenice Illades-Aguiar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biomedicine and <sup>2</sup>Laboratory of Cytopathology and Histochemistry of the School of Chemical and Biological Sciences, Autonomous University of Guerrero, Chilpancingo, Guerrero 39090, Mexico.

Corresponding author: Berenice Illades-Aguiar, Ph.D. Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Chilpancingo, Guerrero 39090, México. E-mail: [b.illadesaguiar@gmail.com](mailto:b.illadesaguiar@gmail.com)

## **Key words**

DNA methylation, HPV 16, HPV 18, biomarkers, cervical cancer, L1 gene, squamous intraepithelial lesion, integration.

## **Running title**

TORRES-ROJAS et al: METHYLATION OF L1 GENE AND HPV 16/18 INTEGRATION.

Co-authors E-mail addresses:

FITR: [trisrael5@yahoo.com.mx](mailto:trisrael5@yahoo.com.mx)

LCAR: [luzdelcarmen14@gmail.com](mailto:luzdelcarmen14@gmail.com)

JOO: [julioortiz771210@gmail.com](mailto:julioortiz771210@gmail.com)

MAMC: [mglmendoza7@gmail.com](mailto:mglmendoza7@gmail.com)

DHS: [danhs1mx@yahoo.com](mailto:danhs1mx@yahoo.com)

HARR: [qmko\\_HGO@hotmail.com](mailto:qmko_HGO@hotmail.com)

OMH: [odelmoralh@gmail.com](mailto:odelmoralh@gmail.com)

DLI: [dinorah.leyva@hotmail.com](mailto:dinorah.leyva@hotmail.com)

EFA: [efloresa\\_2@hotmail.com](mailto:efloresa_2@hotmail.com)

MALV: [leyvamarco13@gmail.com](mailto:leyvamarco13@gmail.com)

## **Abstract**

High-risk human papillomavirus (HPV) is the primary cause of cervical carcinoma. Viral integration into host chromosomes is associated with neoplastic progression, and epigenetic changes may occur. The objective of the present study was to analyze HPV L1 gene methylation and to compare the use of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), *in situ* hybridization (ISH) and L1 methylation as methods for detecting HPV integration. Cervical scrapes or biopsy samples positive for HPV 16 or 18, from 187 women with cervical carcinoma (CC), a squamous intraepithelial lesion (SIL) or no intraepithelial lesion (non-IL), were analyzed. Methylation of L1 was determined using bisulfite modification followed by PCR, and HPV integration was subsequently analyzed. HPV 16 L1 methylation was found to increase with histological grade: High-grade SIL vs. CC,  $P=0.02$ ; low-grade SIL vs. CC,  $P=0.00008$ ; non-IL vs. CC,  $P=0.00001$ . HPV 18 L1 methylation also increased according to histological grade; however, no statistically significant differences were observed. Methylation at CpG site 5608 of the HPV 16 L1 gene was associated with all grades of cervical lesions, whereas methylation at CpG site 5617 demonstrated the strongest association with CC (odds ratio, 42.5; 95% CI, 4.7-1861;  $P<0.0001$ ). The concordance rates between the various methods for the detection of the physical status of HPV 16 and HPV 18 were 96.1% for RT-qPCR and ISH, 76.7% for RT-qPCR and L1 methylation, and 84.8% for ISH and L1 methylation. In conclusion, methylation of the HPV 16 L1 gene increases significantly according to the grade of a cervical lesion, and methylation at CpG sites 5608 and 5617 of this gene may be used as a prognostic biomarker.

ISH and L1 methylation have good concordance with RT-qPCR with regard to the detection of HPV integration; therefore, these are useful methods in determining the physical state of HPV.

## **Introduction**

The primary cause of cervical carcinoma is persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV). The infecting HPV type, viral persistence, viral integration status and viral load contribute to the pathogenesis of cervical carcinoma (1). Among the HR-HPVs, HPV 16 and 18 are the most common in cases of cervical carcinoma worldwide (2).

Cervical carcinoma is the third most common type of cancer among women worldwide (3). In Mexico, it is the second most frequent cancer type among women and the most common female cancer type in women aged 15-44 years; ~9.4% of women in the general population are estimated to harbor cervical HPV infection, and 70.2% of cervical carcinoma cases are attributed to HPV 16 or 18 (4). In the state of Guerrero in southern Mexico, cervical carcinoma is the most common type of cancer in women, and this state has the fifth highest mortality rate from cervical cancer in the country (<http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/12951/MortalidadCaCu2000a2013.pdf>);

HPV 16 is the most common genotype in cervical carcinoma, followed by HPV 18 (5).

Cytological screening of Papanicolaou smears has reduced the incidence and mortality rates of cervical carcinoma; however, the low sensitivity and low reproducibility of cytological tests have caused over-intervention. Although HPV DNA testing may be used as an adjunct procedure, this does not discriminate between transient and persistent infections (6).

HPV genomes replicate as episomal DNA during productive infections and integration of HR-HPV genomes into host chromosomes has been associated with neoplastic progression (7). The E2 HPV gene has been found to be broken more frequently compared with other sites (8-10). This brake results in a loss of negative-feedback control of the transcription of oncogenes E6 and E7 (11), enabling tumor development and progression (12, 13); therefore, HPV integration into the human genome is considered an important event in cervical carcinogenesis. Although certain studies suggest that integration is a late event (13, 14), others have proposed that integration may be an early event in carcinogenesis (15-19).

Based on this information, a reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) method that uses PCR amplification of the E2 and E6 open reading frames (ORFs) and calculation of E2/E6 ratios to measure integration was developed (19). Identification of integrated HPV has been proposed as a useful biomarker for lesion progression; nevertheless, RT-qPCR is a technically difficult method for use in clinical practice.

HPV integration can render viral and cellular genes susceptible to epigenetic changes, which can in turn regulate their expression (20). The L1 gene from HPV 16 and 18 has been observed to be frequently hypermethylated in cancer, in contrast to the infrequent methylation observed in premalignant lesions (17, 21-25). It has been reported that methylation of the HPV 16 L1 gene indicates integration, is associated with the grade of premalignant lesions and cancer, and is a potential clinical marker of cervical carcinoma progression (17, 26-28).

HPV integration and the grade of cervical neoplasia may also be demonstrated using a tyramide-based *in situ* hybridization (ISH) method. Punctate signals within the nucleus are consistent with the integration of HPV into host cell chromosomes, whereas diffuse signal patterns throughout the nucleus are consistent with episomal DNA (29-32).

The use of novel tools in addition to the cytological diagnosis of premalignant lesions could improve the sensitivity of this method, making it more effective, which would reduce the number of misdiagnosed cases and prevent unnecessary invasive treatments in women diagnosed with premalignant lesions. As HPV integration is a viral marker for lesion progression, it is important to use a technically simple and affordable method for the detection of integration in clinical practice.

The aim of the present study was to analyze L1 gene methylation in cervical lesions of various grades, and perform a comparative analysis between L1 methylation, ISH and RT-qPCR as methods to determine the physical status of HPV 16 and 18. Additionally, the handling of these methods was compared.

## **Materials and methods**

### *Clinical specimens.*

The 187 participants of the present study were women aged between 28 and 51 years, who were selected among 1,115 female residents of the state of Guerrero in southern Mexico. The women were attended to at the Unit for Early Diagnosis of Cervical Cancer and HPV at the Autonomous University of Guerrero (Chilpancingo, Mexico), and the Cancer Institute of the State of Guerrero (Acapulco, Mexico) between November 2013 and August 2015. Cervical scrapes or biopsies were collected for cytomorphological examination by liquid cytology or histological examination. Papanicolau smears were reviewed by a certified cytopathologist (L.C.A.R.) and biopsies by a certified histopathologist (M.A.J.L). DNA was extracted from the cervical scrapes or biopsies using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol method (33) for HPV detection and typing with an INNO-LiPA genotyping kit (Fujirebio Europe N.V., Ghent, Belgium) (34).

All patients included in the study presented with HPV 16 (n=154) or HPV 18 (n=33), and cervical carcinoma (CC) (n=33), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) (n=13), low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (n=102) or no intraepithelial lesion (non-IL) (n=39). Cytological diagnosis was performed according to the Bethesda System (35), and histological diagnosis according to the classification system of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (36). Clinical data from the patients were obtained from the database of the Molecular Biomedicine and Cytopathology Laboratories at the School of Chemistry and Biology of the Autonomous University of Guerrero.

The Bioethics Committee of the Autonomous University of Guerrero approved this study. Informed consent was obtained from the patients when the samples were collected.

The samples were studied to analyze L1 gene methylation in the different grades of cervical lesion and to compare L1 methylation, ISH and RT-qPCR as methods to determine the physical status of HPV 16 and 18.



*Analysis of methylation of the HPV 16 and HPV 18 L1 gene.*

Methylation of the L1 gene from HPV 16 and 18 was analyzed by bisulfite conversion reaction, wherein unmethylated cytosine is converted into uracil, followed by PCR amplification. DNA (400-1,200 ng) from cervical samples was treated with bisulfite using an EZ DNA Methylation-Gold™ kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

The 5' and middle regions of the HPV 16 L1 gene, and 5' and 3' regions of HPV 18 L1 gene were amplified by PCR. Amplifications were performed using 100-150 ng of bisulfite-treated genomic DNA, 6 µl of Amplitaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), 1 µmol of sense primer and 1 µmol of antisense primer in a 15 µl final reaction volume. The following primers were used for amplification: HPV 16 L1 5' region, F-5'-TTGTTGATGTAGGTGATTTTTATTTATATTTTAGTTCCA-3' and R-5'-CTAATACCCACACCTAATAACTAACC-3' [melting temperature (T<sub>m</sub>), 59°C] (27); HPV 16 L1 middle region, F-5'-ATTTAGATTATATTAATAATGGTGTAGAAAT-3' and R-5'-AAATAATTAATTACCCCAACAATAACC-3' (T<sub>m</sub>, 54°C) (26); HPV 18 L1 5' region, F-5'-GGTTAGTTTTTAGGTGTTGGT-3' and R-5'-CACACAACACTACCAAATAAAAACA-3' (T<sub>m</sub>, 54°C); and HPV 18 L1 3' region, F-5'-TTATTAGTTTGGTGGATATATATTG-3' and R-5'-AAAACATACAAACACAACAATAAATA-3' (T<sub>m</sub>, 59°C) (37). The thermal cycling conditions were as follows: 10 min at 96°C, followed by 40 cycles of 30 sec at 96°C, 30 sec at 54°C or 59°C, and 7 min at 72°C. The PCR-amplified fragments were sequenced using Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing in an ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Methylation of 12 (5602 to 6580) and 18 (6015 to 7123) CpG dinucleotides in the HPV 16 and HPV 18 L1 gene, respectively, were analyzed using LALIGN software ([http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/LALIGN_form.html)). For the analysis of L1 gene methylation variation in the samples, the methylation ratio (L1MR) was calculated using the formula  $L1MR (\%) = (\text{number of methylated CpGs in the analyzed region of the L1 gene}) / (\text{number of all CpGs in the analyzed region of the L1 gene}) \times 100$  (27). Oka *et al* (27) proposed that the L1MR is associated with the grade of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and indicates the HPV genome status in the cell: A high L1MR value

indicates HPV genome integration, whereas a low L1MR indicates episomal HPV genomes. Complete methylation (>80%) is considered to indicate HPV integration, intermediate methylation (20-80%) to indicate mixed status, and low methylation (<20%) to indicate episomal HPV genome (38).

#### *Analysis of HPV 16 and 18 integration by RT-qPCR*

The physical state of HPV16 was analyzed by RT-qPCR, amplifying two regions of the E2 gene and a region of the E6 gene using the following primers and TaqMan probes (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.): E2A region (transactivation domain), F-5'-TGGATATACAGTGGGAAGTGCAGTTTG-3' and R-5'-CCACAGTTACTGATGCTTCTTCACA-3' primers, and 5'FAM-ATGGAGACATATGCAATAACAAT-NFQ probe; E2B region (hinge), F-5'-CAGCAACGAAGTATCCTCTCCT-3' and R-5'-GCGACGGCTTTGGTATGG-3' primers, and 5'FAM-AAGTGCTGCCTAATAATTTC-NFQ probe; and E6 region, F-5'-ACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTA-3' and R-5'-GCTTTTTGTCCAGATGTCTTTGCTT-3' primers and 5'FAM-AAAGCCACTGTGTCCTG-NFQ probe.

Similarly, the physical state of HPV 18 was analyzed by amplifying two regions of the E2 gene and a region of the E6 gene using the following primers and TaqMan probes (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.): E2N1 region (transactivation domain), F-5'-GCAACTAATACGTTGGGAAAATGCA-3' and R-5'-GCTGGCACCACCTGGT-3' primers, and 5'FAM-CTGTATGCCATGTTCCC-NFQ probe; E2H1 region, F-5'-GATTGTAATGACTCTATGTGCAGTACCA-3' and R-5'-CGGTGCCCACGGACA-3' primers, and FAM-ACGACACGGTATCCGC-NFQ probe; and E6 region, F-5'-AAAATAACTAACACTGGGTTATAACAATT-3' and R-5'-CTGCTGGATTCAACGGTTTCTG primers, and 5'FAM-CACCGCAGGCACCTTA-NFQ probe.

To calculate number of cells, a region of the RNase P single copy gene was amplified using F-5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3' and R-5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'

primers, and a VIC-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-TAMRA RNase P probe (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.; #4403328).

In all cases, PCR was performed in a final volume of 10  $\mu$ l containing 50 ng of DNA, 5  $\mu$ l of Universal MasterMix II (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 0.5  $\mu$ l of a mix containing specific primers and probes for each gene and region. DNA amplification by RT-qPCR was performed in an ABI-PRISM 7500 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) using the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. All reactions were run in duplicate, demonstrating high reproducibility, and the results were averaged for analysis. The positive control consisted of DNA from the SiHa cell line, which contains 1-2 integrated copies of the HPV 16 genome, and the HeLa cell line, which contains integrated HPV 18. The negative controls consisted of the reaction components without DNA (39-41).

A standard curve for the quantification of the RNase P gene was generated using the commercial kit Taqman Copy Number Reference Assay RNase P (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific) with genomic DNA obtained from 10,000, 5,000, 2,500, 1,250 and 625 cells. Standard curves for the E2 and E6 genes were generated by determining the threshold cycle (Ct) of detection with concentrations of  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  and  $10^3$  copies/ $\mu$ l of plasmids containing the HPV 16 or HPV 18 genome. All assays were performed in duplicate. The number of copies of each gene (x) in the sample was calculated with the formula  $x = \exp[(Y-b)/m]$ ; in this formula, y is the Ct value, and b and m are constant values obtained from the equation graph for the standard curve of each gene (42).

The physical state of HPV 16 was determined by calculating the ratios of E2A/E6 and E2B/E6. To ensure the validity of the method, these ratios were determined using the standard curves obtained from various dilutions of pUC8 and DNA from SiHa cells; pUC8 contains the complete HPV 16 genome, representing the episomal form, and SiHa cells were used as the integrated form (43). Viral genome integration was defined by the absence of E2 or an E2/E6 ratio of <0.001. An E2A/E6 ratio of 0.001-0.9270 was defined as a mixture of episomal and integrated forms. When the ratio was >0.9270, it was defined as the episomal form. An E2B/E6 ratio of 0.001-0.9116 was defined as mixed form, and an E2B/E6 ratio of >0.9116 was defined as the episomal form (41).

The physical state of HPV 18 was determined by calculating the ratios of E2N1/E6 and E2H1/E6. To ensure the validity of this method, these ratios were determined using standard curves obtained from various dilutions of a plasmid containing the HPV 18 genome, representing the episomal form. Viral genome integration was defined by the absence of E2 or an E2/E6 ratio of  $<0.001$ . An E2N1/E6 ratio of 0.001-0.9151 was defined as the mixed form, and  $>0.9151$  was defined as the episomal form. An E2H1/E6 ratio of 0.001-0.9206 was defined as the mixed form, and an E2H1/E6 ratio  $>0.9206$  was defined as the episomal form (41).

#### *Analysis of HPV 16 and 18 integration by ISH.*

Detection of high-risk HPV genome integration was performed using ISH with a GenPoint Tyramide Signal Amplification System (Dako, Carpinteria, CA, USA). Cytological samples were placed in a solution of acetone for 5 min. The monolayer smears were digested for 1 min at 37°C with proteinase K (1:1,000). Biotinylated viral DNA with probes for 13 HR-HPV genotypes (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) and individual probes directed at HPV 6 and HPV 11 were subsequently applied. The slides were denatured for 10 min at 95°C, hybridized with a biotinylated HPV DNA probe (Dako) for 20 h at 37°C (Hybridizer; Dako) and then placed in an astringent solution (1:50) at 55°C for 20 min; primary streptavidin peroxidase (1:100) was added for 40 min at room temperature, followed by biotinyl-tyramide for 20 min, and a secondary antibody with streptavidin was subsequently added for 20 min. The chromogen 3,3'-diaminobenzidine (Dako) was then added and Mayer's hematoxylin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was used as a contrast dye. Positive reactions were visualized as a brown color inside of the nucleus and, according to the type of signal, were classified as diffuse (episomal state), punctate (integrated state) or diffuse and punctate (mixed state) (29, 30, 32). SiHa cell lines (containing HPV 16) were used as positive controls to show an integrated state; the same cell lines without probes were used as negative controls.

### *Statistical analysis.*

L1MR was compared between groups using the *t* test with SIGMAPLOT V10 software (<https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/>);  $P < 0.05$  was considered to indicate statistically significant differences. Odds ratios (ORs) were calculated to determine the risk of lesion progression due to methylation of specific CpG sites using STATA version 11 software (<http://www.stata.com/>). Concordance between the various methods for the detection of viral integration was also calculated (44).

## **Results**

### *Methylation of the HPV 16 and HPV 18 L1 gene in cervical specimens from women with cervical carcinoma, squamous intraepithelial lesions and non-IL.*

The methylation status of the HPV 16 and HPV 18 L1 gene was evaluated in 187 cervical specimens from women with cervical cancer, HSIL, LSIL and non-IL. The median HPV 16 L1MRs were 20.2% for non-IL, 30% for LSIL, 33% for HSIL and 58.6% for CC. HPV 16 L1MR was correlated with histological grade: Statistically significant differences were identified in HSIL vs. CC ( $P=0.02$ ), LSIL vs. CC ( $P=0.00008$ ) and non-IL vs. CC ( $P=0.00001$ ) (Fig. 1A). For HPV 18, the median L1MRs were 73.3% for non-IL, 64.1% for LSIL, 69.7% for HSIL and 85.7% for CC; however, these differences between histological grades were not found to be significant (Fig. 1B).

A total of 12 CpG dinucleotides (from 5602 to 6580) in the HPV 16 L1 gene and 18 CpG sites (from 6015 to 7123) in the HPV 18 L1 gene were analyzed in specimens from patients with non-IL, LSIL, HSIL and CC. In HPV 16, methylation of CpG sites 5608 and 5617 was associated with LSIL, methylation of CpG sites 5602 and 5608 was associated with HSIL, and CpG sites 5608, 5617, 5709, 5726, 5926, 5962 was associated with CC. The strongest association with CC was CpG site 5617 (OR, 42.5; 95% CI, 4.7-1861;  $P < 0.0001$ ), followed by CpG sites 5926, 5608, 5709 and 5962. Only CpG site 5608 was associated with

all grades of cervical lesions. In CC samples, the highest L1MR was at CpG site 5617 (71.4%) (Fig. 2A).

High L1MRs at CpG sites in HPV 18 were detected in all grades of cervical lesions: 100% methylation was detected at 10 CpG sites in CC, 5 CpG sites in HSIL, 5 CpG sites in LSIL and 5 CpG sites in non-IL samples. However, methylation differences in CC, HSIL, LSIL compared with non-IL were not significant (Fig. 2B).

#### *Analysis of HPV 16 and HPV 18 integration by RT-qPCR, ISH and L1 methylation.*

The physical statuses of HPV 16 and HPV 18 were evaluated using RT-qPCR, ISH and L1 methylation in cervical specimens from CC, HSIL, LSIL and non-IL. HPV 18 was more frequently integrated compared with HPV 16; HPV 18 was integrated in 50% (RT-qPCR), 100% (ISH) and 67% (L1 methylation) of CC specimens, while HPV 16 was integrated in 52% (RT-qPCR), 92% (ISH) and 16% (L1 methylation). It is important to note that non-IL and LSIL showed high rates of integration of HPV 16: 50% and 39% by RT-qPCR, 33% and 45% by ISH, but only 6% and 7% by L1 methylation, respectively. HPV 18 was not integrated in non-IL, according to the RT-qPCR and ISH analyses, but did exhibit integration in LSIL (10% by RT-qPCR, 53% by ISH and 25% by L1 methylation) (Table I).

The concordance rate between RT-qPCR and ISH for the detection of the physical status of HPV 16 and HPV 18 was 96.1%. The concordance rates between RT-qPCR and L1 methylation, and between ISH and L1 methylation were 76.7% and 84.8%, respectively (Table II).

## **Discussion**

The purpose of the present study was to investigate L1 gene methylation among various grades of cervical lesions positive for HPV 16 or HPV 18. Additionally, L1 methylation, ISH and RT-qPCR were compared as methods to determine the integration of HPV 16 and HPV 18 in cervical specimens, including cervical carcinoma, premalignant lesions and non-cervical lesions.

The results indicated that the HPV 16 L1 gene undergoes a significant progressive increase in methylation rate, according to the increase of the grade of the cervical lesion, in concordance with previous reports (22, 27, 45-47). However, higher methylation rates in non-IL and LSIL specimens were observed in the present study compared with previous studies (27). Methylation of L1 increases progressively through the four pathological categories (non-IL, LSIL, HSIL and CC); however, it is important to note that methylation is present in the absence of a cervical lesion in tissue positive for HPV 16 (L1MR, 20.2% in non-IL).

A progressive increase in methylation of the HPV 18 L1 gene was detected in non-IL, LSIL, HSIL and CC samples, with no significant differences between the different grades of cervical lesion. There are certain differences among the results obtained by various previous studies: Badal *et al* (37) reported the presence of L1 methylation in HPV 18-positive samples from cervical cancer and asymptomatic patients, whereas Turan *et al* (24) reported unmethylated HPV 18 L1 gene in samples from asymptomatic infections and infections with premalignant lesions, but strong methylation in all cervical carcinomas. Kalantari *et al* (46) reported that methylation of HPV 16 and HPV 18 is lowest in cases of asymptomatic infection and increases successively during progression to cancer.

Kalantari *et al* (46) hypothesize that highly methylated LSIL and HSIL samples are those that have undergone certain molecular changes that predispose them to develop into cancer. We concur with this hypothesis, although we suggest that the level of methylation should be taken into account even in patients without cervical lesions, as this may indicate the possibility of lesion progression.

The importance of specific sites of methylation in the HPV genome in identifying women who are at an increased risk of developing cervical carcinoma has been suggested previously (23, 47-49).

In the present study, 12 methylation CpG sites of the HPV 16 L1 gene were analyzed in samples from non-IL, LSIL, HSIL and CC; methylation of 5608 CpG site was associated with the development of LSIL, HSIL and CC, while methylation of 5617 CpG site was associated with LSIL and CC, and methylation of 5709, 5726, 5926 and 5962 CpG sites was associated only with CC. Mirabello *et al* (47) identified a strong association between methylation at the 6457 CpG site and CIN2 (HSIL); in a subsequent study (49), a strong association between methylation at the 5602, 5608, 5611 and 5617 CpG sites and cervical

precancer was found. Sun *et al* (28) found increased methylation of CpG sites in HPV16 L1 associated with CIN1, CIN2 and CIN3 (LSIL/HSIL). Lorincz *et al* (23) reported higher methylation of 6367 and 6389 L1 CpG sites in women with CIN2/3. Brandsma *et al* (50) reported that the frequency of methylation was highest for CIN3, followed by CIN2 and CIN1 at the 5602, 5608, 5709, 5726, 6367, 6389, 6581 (referred to as 5600, 5606, 5707, 5724, 6365, 6387 and 6579) L1 CpG sites. Our results coincide with the aforementioned studies and the observed differences in the sites of CpG methylation in the HPV 16 L1 gene may be due to the circulating HPV 16 variants in each geographical region. Previous studies performed by our research group in the state of Guerrero in southern Mexico, revealed 27 variants of HPV 16 that belong to the European and Asian-American sublineages (51). Nucleotide differences between variants could determine changes in HPV 16 methylation.

To date, studies indicate that there is increasing evidence that elevated methylation at specific HPV 16 CpG sites in the L1 ORF may be a promising biomarker of progression from premalignant lesions to cervical carcinoma. We are in agreement with Mirabello *et al* (47) that a methylation assay in one or a small number of CpG sites would be easier to perform, minimize costs and could potentially serve as a prognostic biomarker to predict the development of premalignant lesions and cervical carcinoma.

In HPV 18, analysis of 18 CpG sites was performed in all grades of cervical lesions, revealing that none of the sites were significantly associated with the development of cervical carcinoma or premalignant lesions. However, high L1MRs in a number of CpG sites were detected in non-IL, LSIL, HSIL and CC, which could indicate the possibility that certain changes have occurred that predispose the tissue to develop into cancer, as proposed by Kalantari *et al* (46), considering that viral methylation appears to occur years before the detection of premalignant lesions (47).

Integration of high-risk HPV genomes is a key event in cervical carcinogenesis as it contributes to neoplastic transformation. Integration of viral genomes is a consequence of chromosomal instability induced by deregulated E6 and E7 oncogene expression (52). There are several methods that may be used to detect HPV integration in the human genome such as RT-qPCR (19), ISH (29,30), L1 methylation (17). However, few studies have compared such methods by which to determine the physical state of HPV. Fujii *et al* (53) compared ISH with RT-qPCR, in SIL and CC samples, reporting an 86% concordance rate between the two



methods. Biesaga *et al* (54) also compared ISH with RT-qPCR to assess physical viral genome state in CC samples and found no significant difference between these methods, concluding that ISH could be applied to assessment of viral genome status.

To our knowledge, no studies comparing RT-qPCR, ISH and L1 gene methylation assay have been performed to evaluate HPV 16 integration. In the present study, these three methods were compared. Good concordance was identified between them, and there were certain advantages in each one. RT-qPCR is a useful technique for detecting integrated and episomal forms of HPV. This method has the advantage of also calculating viral copy numbers for episomal and integrated HPV, providing a prognostic tool for determining the risk of cervical carcinoma (19). L1 methylation is a frequent response to integration. Therefore, it has been proposed that L1 gene methylation indicates integration, and may therefore be used as a potential biomarker of cancer progression (17, 55). ISH with signal amplification by tyramide to demonstrate HPV DNA has the advantage of preserving the histological context of a lesion and allows the detection of low-copy DNA (56). It is accepted that a diffuse signal indicates the episomal status and punctate signals represent integrated HPV (30). The ISH assay with signal amplification by tyramide is convenient for routine purposes (57). According to the current results, it has a high concordance with RT-qPCR (96.1%) and also with the HPV L1 gene methylation assay (84.8%). In our experience, ISH is easier to handle, requiring less technology; however, expertise is essential for proper interpretation.

In conclusion, methylation of the HPV 16 L1 gene increases significantly according to the grade of cervical lesion. CpG site 5608 is associated with premalignant lesions and cervical carcinoma, whereas CpG site 5617 has the strongest association with CC; therefore, these two sites may be useful as prognostic biomarkers. Furthermore, ISH and L1 methylation analyses have good concordance with RT-qPCR and are, therefore, useful methods for determining the physical state of HPV. However, the combination of these techniques could provide more reliable results.

## **Acknowledgements**

This study was supported by a grant from CONACYT (201579). Francisco Israel Torres-Rojas was also supported by a graduate scholarship from CONACYT. The authors

would like to thank Marco Antonio Jiménez-López of the Instituto Estatal de Cancerlogía “Dr. Arturo Beltrán Ortega” for histopathological diagnosis. They also wish to thank the technicians of the Cytopathology and Histochemistry Laboratory for their assistance.

## References

1. zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350, 2002.
2. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al.: Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-527, 2003.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al.: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49: 1374-1403, 2013.
4. L. Bruni LB-R, B. Serrano, M. Brotons, R. Cosano, J. Munoz, FX Bosch, S de Sanjosé, X. Castellsagué: ICO Information centre on HPV and cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in México. Summary Reports 2014.
5. Illades-Aguilar B, Alarcon-Romero Ldel C, Antonio-Vejar V, et al.: Prevalence and distribution of human papillomavirus types in cervical cancer, squamous intraepithelial lesions, and with no intraepithelial lesions in women from Southern Mexico. *Gynecol Oncol* 117: 291-296, 2010.
6. Pinto AP, Degen M, Villa LL and Cibas ES: Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'. *Acta Cytol* 56: 109-121, 2012.
7. Pett M and Coleman N: Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212: 356-367, 2007.
8. Badaracco G, Venuti A, Sedati A and Marcante ML: HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* 67: 574-582, 2002.
9. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B and Johansson B: Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17: 146-153, 1998.
10. Romanczuk H and Howley PM: Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3159-3163, 1992.
11. Jeon S and 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1654-1658, 1995.
12. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B and Johansson B: Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10: 46-54, 2001.
13. Kalantari M, Villa LL, Calleja-Macias IE and Bernard HU: Human papillomavirus-16 and -18 in penile carcinomas: DNA methylation, chromosomal recombination and genomic variation. *Int J Cancer* 123: 1832-1840, 2008.
14. zur Hausen H: Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92: 690-698, 2000.
15. Gallo G, Bibbo M, Bagella L, et al.: Study of viral integration of HPV-16 in young patients with LSIL. *J Clin Pathol* 56: 532-536, 2003.
16. Huang LW, Chao SL and Lee BH: Integration of human papillomavirus type-16 and type-18 is a very early event in cervical carcinogenesis. *J Clin Pathol* 61: 627-631, 2008.
17. Kalantari M, Chase DM, Tewari KS and Bernard HU: Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. *J Med Virol* 82: 311-320, 2010.

18. Kulmala SM, Syrjanen SM, Gyllensten UB, et al.: Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology. *J Clin Pathol* 59: 513-517, 2006.
19. Peitsaro P, Johansson B and Syrjanen S: Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40: 886-891, 2002.
20. Das P, Thomas A, Mahantshetty U, Shrivastava SK, Deodhar K and Mulherkar R: HPV genotyping and site of viral integration in cervical cancers in Indian women. *PLoS One* 7: e41012, 2012.
21. Bird A: DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21, 2002.
22. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, et al.: Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 78: 12762-12772, 2004.
23. Lorincz AT, Brentnall AR, Vasiljevic N, et al.: HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer* 133: 637-644, 2013.
24. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, et al.: Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression? *Virology* 349: 175-183, 2006.
25. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H and Bernard HU: High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology* 361: 185-193, 2007.
26. Brandsma JL, Sun Y, Lizardi PM, et al.: Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* 389: 100-107, 2009.
27. Oka N, Kajita M, Nishimura R, Ohbayashi C and Sudo T: L1 gene methylation in high-risk human papillomaviruses for the prognosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 23: 235-243, 2013.
28. Sun C, Reimers LL and Burk RD: Methylation of HPV16 genome CpG sites is associated with cervix precancer and cancer. *Gynecol Oncol* 121: 59-63, 2011.
29. Evans MF, Aliesky HA and Cooper K: Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol* 3: 2, 2003.
30. Evans MF, Mount SL, Beatty BG and Cooper K: Biotinyl-tyramide-based in situ hybridization signal patterns distinguish human papillomavirus type and grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 15: 1339-1347, 2002.
31. Vega-Pena A, Illades-Aguar B, Flores-Alfaro E, et al.: Risk of progression of early cervical lesions is associated with integration and persistence of HPV-16 and expression of E6, Ki-67, and telomerase. *J Cytol* 30: 226-232, 2013.
32. Zubillaga-Guerrero MI, Illades-Aguar B, Leyva-Vazquez MA, et al.: The integration of HR-HPV increases the expression of cyclins A and E in cytologies with and without low-grade lesions. *J Cytol* 30: 1-7, 2013.
33. Ausubel F, Brent R, Kingston R, et al.: *Protocols in Molecular Biology*. pp 2-3, 1995.
34. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al.: Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 37: 2508-2517, 1999.

35. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al.: The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 287: 2114-2119, 2002.
36. Benedet JL, Bender H, Jones H, 3rd, Ngan HY and Pecorelli S: FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 70: 209-262, 2000.
37. Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, et al.: The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 324: 483-492, 2004.
38. Reuschenbach M, Huebbers CU, Prigge ES, et al.: Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. *Cancer* 121: 1966-1976, 2015.
39. Boulet GA, Horvath CA, Berghmans S and Bogers J: Human papillomavirus in cervical cancer screening: important role as biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 810-817, 2008.
40. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, et al.: Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma. *J Clin Microbiol* 46: 3678-3685, 2008.
41. Zhang D, Zhang Q, Zhou L, et al.: Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus-16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study. *BMC Cancer* 10: 650, 2010.
42. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT and Giuliano AR: Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 118: 1187-1193, 2006.
43. Chang L, He X, Yu G and Wu Y: Effectiveness of HPV 16 viral load and the E2/E6 ratio for the prediction of cervical cancer risk among Chinese women. *J Med Virol* 85: 646-654, 2013.
44. Kwiecien R, Kopp-Schneider A and Blettner M: Concordance analysis: part 16 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 108: 515-521, 2011.
45. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, et al.: The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 19: 438-451, 2009.
46. Kalantari M, Osann K, Calleja-Macias IE, et al.: Methylation of human papillomavirus 16, 18, 31, and 45 L2 and L1 genes and the cellular DAPK gene: Considerations for use as biomarkers of the progression of cervical neoplasia. *Virology* 448: 314-321, 2014.
47. Mirabello L, Schiffman M, Ghosh A, et al.: Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 132: 1412-1422, 2013.
48. Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, et al.: Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 2125-2137, 2012.
49. Mirabello L, Frimer M, Harari A, et al.: HPV16 methyl-haplotypes determined by a novel next-generation sequencing method are associated with cervical precancer. *Int J Cancer* 136: E146-153, 2015.
50. Brandsma JL, Harigopal M, Kiviat NB, et al.: Methylation of twelve CpGs in human papillomavirus type 16 (HPV16) as an informative biomarker for the triage of women positive for HPV16 infection. *Cancer Prev Res (Phila)* 7: 526-533, 2014.
51. Ortiz-Ortiz J, Alarcon-Romero Ldel C, Jimenez-Lopez MA, et al.: Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol J* 12: 29, 2015.

52. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, et al.: Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res* 68: 307-313, 2008.
53. Fujii T, Masumoto N, Saito M, et al.: Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol* 14: 103-108, 2005.
54. Biesaga B, Szostek S, Klimek M, Jakubowicz J and Wysocka J: Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia Histochem Cytobiol* 50: 239-247, 2012.
55. Bryant D, Tristram A, Liloglou T, Hibbitts S, Fiander A and Powell N: Quantitative measurement of Human Papillomavirus type 16 L1/L2 DNA methylation correlates with cervical disease grade. *J Clin Virol* 59: 24-29, 2014.
56. Bryan JT, Taddeo F, Skulsky D, et al.: Detection of specific human papillomavirus types in paraffin-embedded sections of cervical carcinomas. *J Med Virol* 78: 117-124, 2006.
57. De Marchi Triglia R, Metze K, Zeferino LC and Lucci De Angelo Andrade LA: HPV in situ hybridization signal patterns as a marker for cervical intraepithelial neoplasia progression. *Gynecol Oncol* 112: 114-118, 2009.

**Disclosure of conflict of interest**

None

Table I. Physical status of HPV 16 and HPV 18 determined by qRT-PCR, ISH and L1 Methylation.

HPV 16 physical status									
qRT-PCR n = 100			ISH n = 140			L1 Methylation n = 154			
Diagnosis	Episomal n=2 n (%)	Mixed n=52 n (%)	Integrated n=46 n (%)	Episomal n=4 n (%)	Mixed n=66 n (%)	Integrated n=70 n (%)	Episomal n=51 n (%)	Mixed n=91 n (%)	Integrated n=12 n (%)
Non-IL	1 (4)	12 (46)	13 (50)	3 (10)	17 (57)	10 (33)	17 (52)	16 (48)	0 (6)
LSIL	1 (2)	27 (59)	18 (39)	1 (1)	43 (54)	36 (45)	28 (34)	48 (59)	6 (7)
HSIL	0 (0)	1 (33)	2 (67)	0 (0)	4 (67)	2 (33)	4 (45)	4 (45)	1 (10)
CC	0 (0)	12 (48)	13 (52)	0 (0)	2 (8)	22 (92)	2 (7)	23 (77)	5 (16)
HPV 18 physical status									
qRT-PCR n = 19			ISH n = 30			L1 Methylation n = 33			
Diagnosis	Episomal n=5 n (%)	Mixed n=12 n (%)	Integrated n=2 n (%)	Episomal n=1 n (%)	Mixed n=14 n (%)	Integrated n=15 n (%)	Episomal n=0 n (%)	Mixed n=23 n (%)	Integrated n=10 n (%)
Non-IL	2 (67)	1 (33)	0 (0)	1 (17)	5 (83)	0 (0)	0 (0)	4 (67)	2 (33)
LSIL	1 (10)	8 (80)	1 (10)	0 (0)	9 (47)	10 (53)	0 (0)	15 (75)	5 (25)
HSIL	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	3 (75)	1 (25)
CC	0 (0)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0 (0)	1 (33)	2 (67)

Non-IL: Non-intraepithelial lesion. LSIL: Low squamous intraepithelial lesion. HSIL: High squamous intraepithelial lesion. CC: Cervical carcinoma. qRT-PCR: Quantitative real time PCR. ISH: *In situ* hybridization.

Table II. Concordance rate of qRT-PCR, *in situ* hybridization and HPV L1 methylation in the detection of the physical status of HPV 16 and HPV 18 in clinical samples.

qRT-PCR / <i>In situ</i> Hybridization n=107				
Physical status		qRT-PCR		Positive concordants (%)*
		Mixed/Integrated	Episomal	
<i>In situ</i> Hybridization	Mixed/Integrated	98	2	96.1
	Episomal	6	1	
qRT-PCR / L1 methylation n=120				
Physical status		qRT-PCR		Positive concordants (%)
		Mixed/Integrated	Episomal	
L1 Methylation	Mixed/Integrated	74	7	76.7
	Episomal	38	0	
<i>In situ</i> Hybridization / L1 Methylation n=172				
Physical status		<i>In Situ</i> Hybridization		Positive concordants (%)
		Mixed/Integrated	Episomal	
L1 Methylation	Mixed/Integrated	123	2	84.8
	Episomal	42	3	

\* Values of 60 to 80% were considered good concordance between the techniques and values greater than 80% were considered very good concordance.



### **Figure legends**

Figure 1. (A) HPV 16 and (B) HPV 18 L1 gene methylation rate (L1MR, %) in non-IL, LSIL, HSIL and CC tissues.  $P < 0.05$  was considered to indicate statistically significant differences. HPV, human papillomavirus; L1MR, L1 methylation ratio; non-IL, non-intraepithelial lesion; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; CC, cervical carcinoma.

Figure 2. Methylation in the L1 gene at various CpG sites in (A) HPV 16 and (B) HPV 18 in non-IL, LSIL, HSIL and CC. The x-axis indicates each individual CpG site by nucleotide position in the L1 gene. HPV, human papillomavirus; non-IL, non-intraepithelial lesion; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; CC, cervical carcinoma.

Figure 1

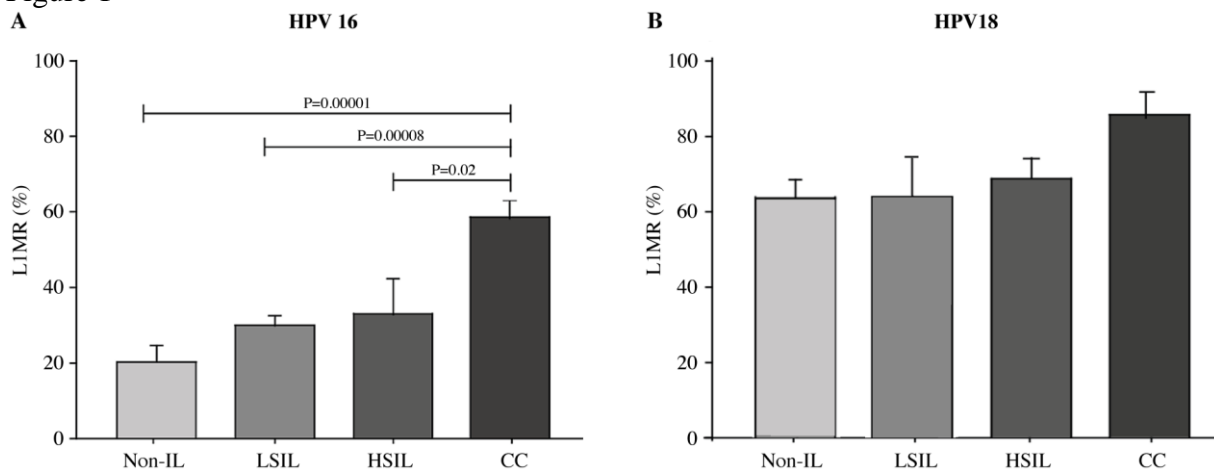
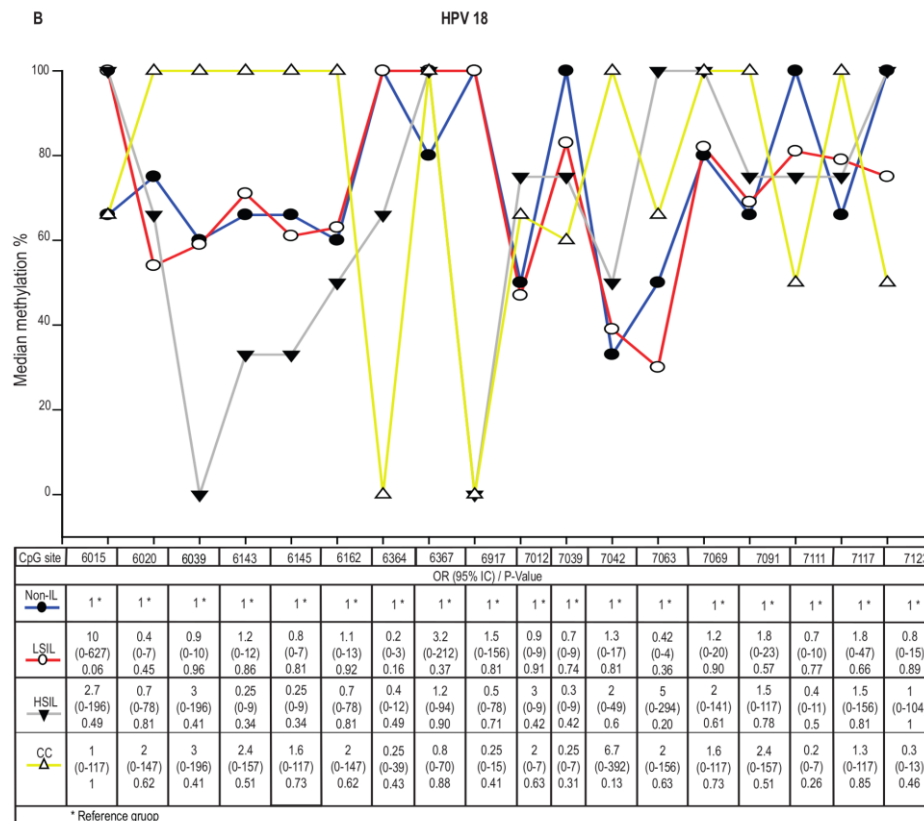
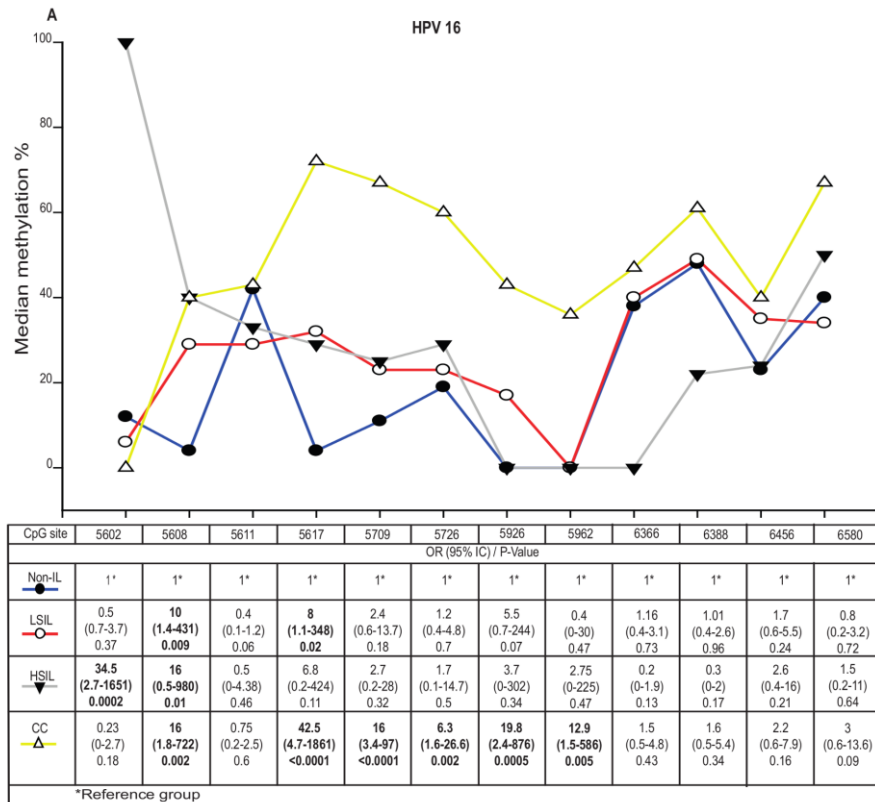


Figure 2



La oncoproteína E6 de variantes del VPH-16 afecta la expresión de DNA metiltransferasas, pero no la metilación de genes supresores de tumor

CAPITULO II

## **Capítulo II**

La oncoproteína E6 de variantes del VPH-16 afecta la expresión de DNA metiltransferasas, pero no la metilación de genes supresores de tumor

## **La oncoproteína E6 de variantes del VPH-16 afecta la expresión de DNA metiltransferasas, pero no la metilación de genes supresores de tumor**

Francisco Israel Torres- Rojas<sup>1</sup>, Daniel Hernández-Sotelo<sup>1</sup>, Berenice Illades-Aguilar<sup>1</sup>.  
Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico Biológicas,  
Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Gro., México

### **Resumen**

El Virus de Papiloma Humano tipo 16 (VPH16), tiene la capacidad de inducir transformación neoplásica a través de la expresión de sus oncoproteínas, E6 y E7. Se han identificado diferentes variantes del VPH16, de las cuales se ha documentado diferente potencial oncogénico. Existe evidencia de que E6 del VPH16 puede interactuar con proteínas involucradas en la regulación epigenética. En este trabajo evaluamos el efecto de E6 del VPH16 E-prototipo y de las variantes AA-a, AA-c y E-G350 en la expresión de DNA metiltransferasas y metilación de genes celulares en la línea celular C-33A.

Los resultados demuestran que E6 prototipo induce un incremento en la expresión de DNMT1, efecto que no se encontró con el resto de las variantes. La expresión de DNMT3A disminuyó con la presencia de E6 prototipo y E6 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c del VPH16, siendo esta disminución significativa. Para DNMT3B, el efecto de la proteína E6 de las variantes incluidas en este estudio, así como E6 prototipo indujo una reducción significativa en los niveles de RNAm de la enzima. Estudios previos demuestran que una gran cantidad de genes celulares se encuentran metilados en cáncer, por lo cual, se analizó si E6 prototipo y/o E6 de las variantes AA-a y AA-c modifica el estado de metilación de promotores de los genes supresores de tumor RAR $\beta$  y THBS1, al respecto encontramos que E6 no cambia el estado de metilación de estos genes.

El hallazgo de la disminución en la expresión de las DNA metiltransferasas inducido por E6 puede ser un indicio de la hipometilación global que existe en el cáncer. Sugerimos la búsqueda en estudios posteriores de otros genes candidato para evaluar el cambio de metilación en su promotor causado por la presencia de E6.

### **Palabras Clave**

E6, Variantes del VPH-16, DNA Metiltransferasas, Metilación del DNA, C-33A

## **Introducción**

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el cáncer de mayor prevalencia en mujeres en 45 países, con reportes de más de 500,000 nuevos casos y 270, 000 muertes cada año (OMS 2014). Es conocido que el agente etiológico del CaCU es el virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR) (zur Hausen, 2009), del cual se han identificado más de 100 genotipos, catalogados en diferentes grupos (bajo riesgo, riesgo indeterminado y alto riesgo) de acuerdo a su asociación con el desarrollo de cáncer (Lizano et al., 2009). El VPH16 es clasificado como de alto riesgo y existen al menos 9 sublinajes clasificados de acuerdo a su distribución geográfica (Cornet et al., 2012, Tornesello et al., 2011). Estas variantes del VPH-16 poseen diferente potencial oncogénico, en base a estudios epidemiológicos la variante más oncogénica es la AA-a (Berumen et al., 2001, Hildesheim et al., 2001, Ortiz-Ortiz et al., 2015). Las oncoproteínas E6 y E7 son las principales proteínas virales responsables del inicio del desarrollo del cáncer y su progresión; p53 y retinoblastoma son blancos específicos de E6 y E7 respectivamente, lo cual ocasiona alteraciones en el ciclo celular (Yim and Park, 2005).

La regulación epigenética juega un papel fundamental en la expresión o inactivación de genes celulares, debido a regiones ricas de dinucleótidos CpG que se encuentran en aproximadamente el 70% de los promotores de genes humanos (Dawson and Kouzarides, 2012, Lund and van Lohuizen, 2004). Los niveles de DNA metiltransferasas, enzimas encargadas de regular la metilación de genes, se encuentran elevados en diversos tipos de cáncer (Subramaniam et al., 2014). Del mismo modo, la metilación en promotores de genes supresores de tumor y reguladores del ciclo celular se incrementa durante el desarrollo de cáncer (Yang, 2013).

Existen reportes de que la presencia del VPH16 incrementa la expresión de DNMT1 y DNMT3B, además que modifica la metilación en promotores de diversos genes celulares (Leonard et al., 2012). En particular, E6 del VPH16 puede regular de manera positiva la expresión de DNMT1 (Au Yeung et al., 2010). Además, E6 de la variante Asiático Americana induce mayor grado de inmortalización en queratinocitos al compararse con E6 E-Prototipo, asimismo se ha corroborado que la proteína E6

de la variante E-G350, en cultivos de queratinocitos, disminuye la diferenciación de estas células (Niccoli et al., 2012, Zehbe et al., 2009).

Con el antecedente de que existen diferencias en la capacidad de inducir transformación celular por parte de las variantes del VPH-16, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto que tiene E6 E-Prototipo y las Variantes AA-a, AA-c y E-G350 en la línea celular C33-A para alterar la expresión de DNA metiltransferasas. Adicionalmente, se analizó la metilación de los genes supresores de tumor RAR $\beta$ , THBS1, *CALCA* y *CDKN2A* en el DNA de las células C33-A para identificar si E6 de alguna de las variantes del VPH16 induce cambios en la metilación del promotor de alguno de estos genes y generar de esta manera genes blanco específicos para cada una de las variantes E6 del VPH-16.

## **Métodos**

### *Selección de variantes del VPH-16*

Se utilizaron células C33-A transfectadas establemente con el fragmento génico correspondiente a E6 prototipo y E6 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c del VPH16 (Zacapala-Gomez et al., 2015).

### *Expresión de DNA metiltransferasas*

Se analizó la expresión de las DNA metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Previa extracción de RNA total de las células C33-A trasfectadas establemente con E6 de VPH 16 E-Prototipo y de las variantes E-G350, AA-a y AA-c por el método de TRizol (Invitrogene), el RNA obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop (ND-2000c Accesolab). La determinación de la expresión de las DNMTs se realizó mediante qPCR utilizando MAXIMA SYBR Green qPCR con los iniciadores específicos: DNMT1 F 5'-AGT GGT GCG TTT GAG A-3' R 5'-TTG GGC TTA TTC CTA ACG GT-3', DNMT3A F 5'- GGT GCT GTC TCT CTT TGA TG-3' R 5'-ATG CTT CTG TGT GAC GCT G-3' (Luczak et al., 2012), DNMT3B F 5'-GGG TGT AAA CTG TGG AAC CC-3', R 5'-GTG AAC CCG GGT GGC CAC TT-3'. La PCR se llevó a cabo en un PIKOREAL 96 THERMOSCIENTIFIC. El ciclaje

de PCR consistió en 40 ciclos desnaturalización a 96°C por 30 segundos, alineamiento a 58°C o 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C, con una desnaturalización inicial durante 5 minutos a 96°C. Como control endógeno fue utilizado GAPDH con los iniciadores F 5'-GGG TGT CAC CCC TTG AAC TT-3' R 5'-AAC TCT GAA CCG TTA AA-3'.

### *Metilación de los genes RAR $\beta$ , THBS1, CALCA, CDKN2A*

Se realizó extracción de DNA a partir de trizol de las células C-33A transfectadas establemente con E6 de VPH 16 E-prototipo y de las variantes seleccionadas. Se modificaron 1500ng del DNA obtenido con bisulfito de sodio, utilizando el kit EpiJET Bisulfite Conversion Kit siguiendo las indicaciones del fabricante. El DNA obtenido, posterior a la modificación con bisulfito, se utilizó inmediatamente o se almacenó a -80°C hasta su uso. Para evaluar la metilación de los genes RAR $\beta$ , THBS1, CALCA, CDKN2A y VAV3 se realizó PCR-SM (PCR Sensible a Metilación) del DNA modificado con bisulfito de sodio. Los iniciadores utilizados fueron: RAR $\beta$  Metilado 5'- GGATTGGGATGTCGAGAAC-3' y 5'- TACAAAAACCTTCCGAATACG-3', para RAR $\beta$  No Metilado 5'- AGGATTGGGATGTTGAGAATG-3' y 5'- TTACAAAAACCTTCCAAATACA-3' (Narayan et al., 2003); para analizar THBS1 Metilado 5'- TGCGAGCGTTTTTTTAAATGC-3' y 5'- TAAACTCGCAAACCAACTCG-3', para THBS1 No Metilado 5'- GTTTGGTTGTTGTTTATTGGTTG-3' y 5'- CCTAAACTCACAAACCAACTCA-3' (Guo et al., 2010); para CALCA Metilado 5'- TTTTAGGTTTTTGGGAAGTATGAGGGTGATG -3' y 5'- TTCCCACCACTATAAATCA-3', para CALCA No Metilado 5'- GTTTTGGAAGTATGAGGGTGACG-3' y 5'- TTCCCGCCGCTATAAATCG-3' (Ismail et al., 2011) CDKN2A Metilado 5'- GTAGGGTTTLAGAGTCGTTTCGA-3' y 5'- AACTACAAACTAAAACCCACGC-3', para CDKN2A No Metilado 5'- CGTAGGGTTTLAGAGTTGTTTTGA -3' y 5'- AACTACAAACTAAAACCCACACA-3' (Lima et al., 2008). Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.



### *Análisis estadístico*

El análisis de expresión de las DNA metiltransferasas se realizó en el software PikoReal 2.2 y el análisis estadístico en el programa SigmaPlot 10.0. Se consideró un valor de p estadísticamente significativo cuando éste fue  $<0.05$ .

### **Resultados**

Se evaluó el efecto de E6 de VPH 16 E-prototipo y variantes sobre la expresión de las 3 principales enzimas involucradas en la regulación de metilación del DNA (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) en la línea celular C33-A.

Al comparar los niveles de RNAm de la enzima DNMT1 en la línea celular C33-A transfectada establemente con E6 del VPH16 E-Prototipo con las variantes E-G350, AA-a y AA-c de VPH16, se encontró una disminución de DNMT1 en las células con E6 de las variantes E-G350 y AA-c en relación a las células con E6 de la E-Prototipo (Figura 1.a). La expresión de la enzima DNMT3A mostró una disminución significativa en las células con E6 de la variante AA-c (Figura 1.b). De manera similar a lo encontrado con DNMT1 y DNMT3A, los niveles de DNMT3B disminuyeron de manera significativa en las células con E6 de la variante AA-c (Figura 1.b)

El análisis de metilación mediante PCR-SM para *RAR $\beta$* , *THBS1*, *CALCA* y *CDKN2A* no mostró cambios de metilación en el promotor de alguno de los genes señalados en ningún grupo de células transfectadas con E6 (Cuadro 1).

### **Discusión**

En el presente estudio se determinó el efecto que tiene la oncoproteína E6 E-Prototipo del VPH-16 y E6 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c en la línea celular C33-A en la expresión de las principales enzimas involucradas en la regulación de metilación del DNA, además se evaluó si E6 posee la capacidad de modificar la metilación en promotores de genes supresores de tumor en la misma línea celular.

Al comparar los niveles de expresión de DNMT1 en la línea celular C33-A transfectada establemente con E6 de VPH16 E-Prototipo, E-G350, AA-a y AA-c, se encontró que E6 de las variantes E-G350 y AA-c disminuyen de manera significativa la expresión de esta DNA metiltransferasa en comparación con E6 de VPH16 E-

Prototipo (figura 1a), este resultado no coincide con lo reportado por Yeung y cols., quienes encontraron una regulación positiva de E6 sobre la expresión de DNMT1 en la línea celular SiHa (Au Yeung et al., 2010).

DNMT3A es una proteína cuyos niveles de expresión se encuentran elevados en muestras de CaCU y líneas celulares VPH positivas al compararlas con líneas celulares VPH negativas (Sartor et al., 2011, Lechner et al., 2013, Luczak et al., 2012). En el análisis realizado se observó una disminución significativa en el nivel de RNA mensajero de DNMT3A causado por la presencia de E6 de la variante AA-c al ser comparadas las E6 de las diferentes variantes del VPH16 (E-G350, AA-a y AA-c) con E6 de VPH16 E-Prototipo (figura 1b). Esta disminución encontrada es similar a lo reportado en queratinocitos humanos que al ser transfectados con VPH16 no presentan cambios significativos en los niveles proteicos de DNMT3A (Leonard et al., 2012), lo que sugiere que E6 del VPH-16 variante AA-c puede regular negativamente la expresión de DNMT3A.

La enzima DNMT3B es una DNA metiltransferasa relacionada con el desarrollo de cáncer, y los niveles tanto proteicos como de RNAm se encuentran elevados en cáncer (Luczak et al., 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan una disminución en los niveles de RNA mensajero de DNMT3B en las células que expresan E6 de la variante AA-c del VPH16 al ser comparadas con células que expresan E6 de VPH16 E-Prototipo (figura 1c), lo cual puede ser comparable con datos obtenidos en muestras de mucosa oral con diagnóstico VPH-16 positivo en las cuales se observó una ligera disminución de la expresión de DNMT3B conforme la displasia aumentó (Fonseca-Silva et al., 2012).

Con esto podemos deducir que sólo E6 de la variante AA-c induce una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión de las tres DNA metiltransferasas estudiadas.

Considerando que las variantes del VPH16 pudieron regular de manera diferencial la expresión de las DNA metiltransferasas, se evaluó si estas diferencias tienen un efecto en la metilación de genes celulares, principalmente en genes que tienen participación en la regulación del ciclo y diferenciación celular (Ismail et al., 2011, Narayan et al., 2003), debido a que se ha observado que la metilación en

promotores de genes celulares se ve alterada durante el proceso cancerígeno (Lendvai et al., 2012, Wentzensen et al., 2009, Yang, 2013).

Los genes analizados en este estudio fueron: RAR $\beta$  el cual se ha descrito como un gen regulador de crecimiento y diferenciación celular (Rochette *et al.*, 2011); THBS1, un inhibidor de angiogénesis (Simantov and Silverstein, 2003), CALCA, un gen involucrado en el metabolismo del calcio sin funciones específicas claras (Huebner et al., 2006) cuya metilación ha sido asociada con la presencia de cáncer (Brait et al., 2008, Liggett et al., 2011, Loyo et al., 2011) y el gen CDKN2A, que es considerado un gen supresor de tumor y cuya desregulación ha sido asociada en cáncer (Foulkes et al., 1997). Sumado a esto, previamente se ha descrito que la metilación en los respectivos promotores de estos genes se incrementa con la presencia de VPH16/18 (Leonard et al., 2012).

El análisis de la metilación mediante PCR-SM no mostró cambios en la metilación del promotor de RAR $\beta$  en las células que expresan E6 de las variantes del VPH16 (Cuadro 1). Como antecedente, se tiene que en casos de cáncer RAR $\beta$  se encuentra silenciado a consecuencia de que la metilación en su promotor se ve incrementada conforme progresa la lesión (Narayan et al., 2003).

En el caso de THBS1 tampoco se encontraron diferencias en la metilación de su promotor en las células que expresan E6 E-Prototipo o E6 variantes E-G350, AA-a y AA-c del VPH16 (Cuadro 1). Este gen se localiza metilado en muestras de cáncer cervicouterino (Kang et al., 2006), y la metilación de su promotor aumenta con la presencia de VPH de alto riesgo (Leonard et al., 2012).

Para el caso de los genes CALCA y CDKN2A, se esperaba que al existir disminución de la expresión de las DNA metiltransferasas existiera también una disminución de su metilación ya que en muestras de cáncer cervical se ha encontrado metilado al promotor de estos genes (Virmani et al., 2001, Siegel et al., 2015, Yang et al., 2004).

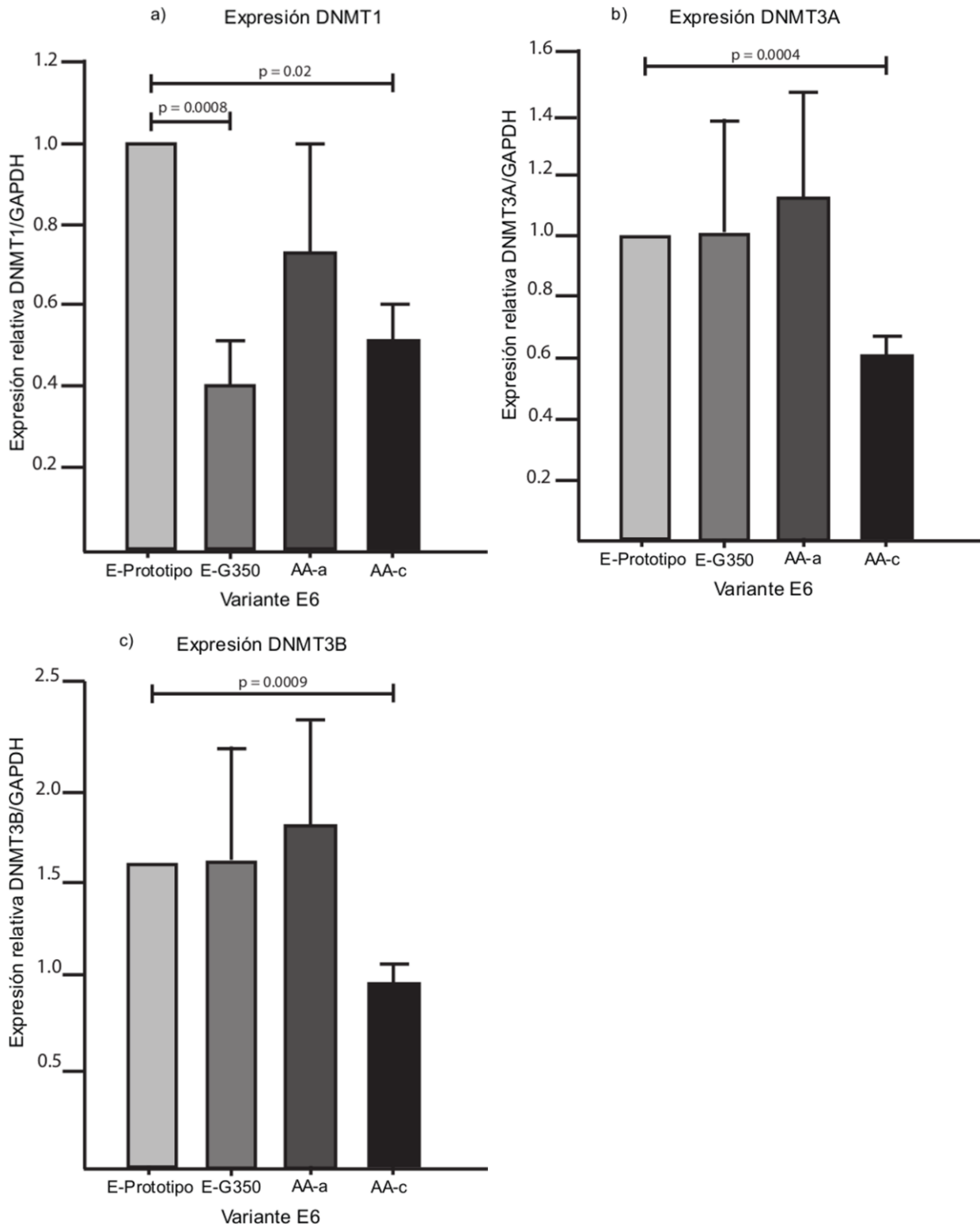
Los resultados sugieren que la alteración en la expresión de las DNA metiltransferasas inducido por E6 de las diversas variantes de VPH16 no modifica la metilación en los genes analizados.

Referencias:

- AU YEUNG, C. L., TSANG, W. P., TSANG, T. Y., CO, N. N., YAU, P. L. & KWOK, T. T. (2010) HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*, 24, 1599-604.
- BERUMEN, J., ORDONEZ, R. M., LAZCANO, E., SALMERON, J., GALVAN, S. C., ESTRADA, R. A., YUNES, E., GARCIA-CARRANCA, A., GONZALEZ-LIRA, G. & MADRIGAL-DE LA CAMPA, A. (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 93, 1325-30.
- BRAIT, M., BEGUM, S., CARVALHO, A. L., DASGUPTA, S., VETTORE, A. L., CZERNIAK, B., CABALLERO, O. L., WESTRA, W. H., SIDRANSKY, D. & HOQUE, M. O. (2008) Aberrant promoter methylation of multiple genes during pathogenesis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 2786-94.
- CORNET, I., GHEIT, T., IANACONE, M. R., VIGNAT, J., SYLLA, B. S., DEL MISTRO, A., FRANCESCHI, S., TOMMASINO, M. & CLIFFORD, G. M. (2012) HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide. *Br J Cancer*, 108, 240-4.
- DAWSON, M. A. & KOUZARIDES, T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150, 12-27.
- FONSECA-SILVA, T., FARIAS, L. C., CARDOSO, C. M., SOUZA, L. R., CARVALHO FRAGA, C. A., OLIVEIRA, M. V., BARROS, L. O., ALVES, L. R., DE-PAULA, A. M., MARQUES-SILVA, L., GOMEZ, R. S. & GUIMARAES, A. L. (2012) Analysis of p16(CDKN2A) methylation and HPV-16 infection in oral mucosal dysplasia. *Pathobiology*, 79, 94-100.
- FOULKES, W. D., FLANDERS, T. Y., POLLOCK, P. M. & HAYWARD, N. K. (1997) The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med*, 3, 5-20.
- HILDESHEIM, A., SCHIFFMAN, M., BROMLEY, C., WACHOLDER, S., HERRERO, R., RODRIGUEZ, A., BRATTI, M. C., SHERMAN, M. E., SCARPIDIS, U., LIN, Q. Q., TERAJ, M., BROMLEY, R. L., BUETOW, K., APPLE, R. J. & BURK, R. D. (2001) Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*, 93, 315-8.
- HUEBNER, A. K., SCHINKE, T., PRIEMEL, M., SCHILLING, S., SCHILLING, A. F., EMESON, R. B., RUEGER, J. M. & AMLING, M. (2006) Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res*, 21, 1924-34.
- ISMAIL, E. A., EL-MOGY, M. I., MOHAMED, D. S. & EL-FARRASH, R. A. (2011) Methylation pattern of calcitonin (CALCA) gene in pediatric acute leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 33, 534-42.
- KANG, S., KIM, J. W., KANG, G. H., LEE, S., PARK, N. H., SONG, Y. S., PARK, S. Y., KANG, S. B. & LEE, H. P. (2006) Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 118, 2168-71.
- LECHNER, M., FENTON, T., WEST, J., WILSON, G., FEBER, A., HENDERSON, S., THIRLWELL, C., DIBRA, H. K., JAY, A., BUTCHER, L., CHAKRAVARTHY, A. R., GRATRICK, F., PATEL, N., VAZ, F., O'FLYNN, P., KALAVREZOS, N., TESCHENDORFF, A. E., BOSHOFF, C. & BECK, S. (2013) Identification and functional validation of HPV-mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Genome Med*, 5, 15.

- LENDVAI, A., JOHANNES, F., GRIMM, C., EIJSINK, J. J., WARDENAAR, R., VOLDERS, H. H., KLIP, H. G., HOLLEMA, H., JANSEN, R. C., SCHUURING, E., WISMAN, G. B. & VAN DER ZEE, A. G. (2012) Genome-wide methylation profiling identifies hypermethylated biomarkers in high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Epigenetics*, 7, 1268-78.
- LEONARD, S. M., WEI, W., COLLINS, S. I., PEREIRA, M., DIYAF, A., CONSTANDINOU-WILLIAMS, C., YOUNG, L. S., ROBERTS, S. & WOODMAN, C. B. (2012) Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33, 1286-93.
- LIGGETT, T. E., MELNIKOV, A., YI, Q., REPLOGLE, C., HU, W., ROTMENSCH, J., KAMAT, A., SOOD, A. K. & LEVENSON, V. (2011) Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 120, 113-20.
- LIZANO, M., BERUMEN, J. & GARCIA-CARRANCA, A. (2009) HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*, 40, 428-34.
- LOYO, M., BRAIT, M., KIM, M. S., OSTROW, K. L., JIE, C. C., CHUANG, A. Y., CALIFANO, J. A., LIEGEOIS, N. J., BEGUM, S., WESTRA, W. H., HOQUE, M. O., TAO, Q. & SIDRANSKY, D. (2011) A survey of methylated candidate tumor suppressor genes in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 128, 1393-403.
- LUCZAK, M. W., ROSZAK, A., PAWLIK, P., KEDZIA, H., KEDZIA, W., MALKOWSKA-WALCZAK, B., LIANERI, M. & JAGODZINSKI, P. P. (2012) Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Int J Oncol*, 40, 860-6.
- LUND, A. H. & VAN LOHUIZEN, M. (2004) Epigenetics and cancer. *Genes Dev*, 18, 2315-35.
- NARAYAN, G., ARIAS-PULIDO, H., KOUL, S., VARGAS, H., ZHANG, F. F., VILLELLA, J., SCHNEIDER, A., TERRY, M. B., MANSUKHANI, M. & MURTY, V. V. (2003) Frequent promoter methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 genes in carcinoma of cervix uteri: its relationship to clinical outcome. *Mol Cancer*, 2, 24.
- NICCOLI, S., ABRAHAM, S., RICHARD, C. & ZEHBE, I. (2012) The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J Virol*, 86, 12384-96.
- ORTIZ-ORTIZ, J., ALARCON-ROMERO LDEL, C., JIMENEZ-LOPEZ, M. A., GARZON-BARRIENTOS, V. H., CALLEJA-MACIAS, I., BARRERA-SALDANA, H. A., LEYVA-VAZQUEZ, M. A. & ILLADES-AGUIAR, B. (2015) Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol J*, 12, 29.
- SARTOR, M. A., DOLINOY, D. C., JONES, T. R., COLACINO, J. A., PRINCE, M. E., CAREY, T. E. & ROZEK, L. S. (2011) Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics*, 6, 777-87.
- SIEGEL, E. M., RIGGS, B. M., DELMAS, A. L., KOCH, A., HAKAM, A. & BROWN, K. D. (2015) Quantitative DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer. *PLoS One*, 10, e0122495.

- SIMANTOV, R. & SILVERSTEIN, R. L. (2003) CD36: a critical anti-angiogenic receptor. *Front Biosci*, 8, s874-82.
- SPENCE, R. P., MURRAY, A., BANKS, L., KELLAND, L. R. & CRAWFORD, L. (1988) Analysis of human papillomavirus sequences in cell lines recently derived from cervical cancers. *Cancer Res*, 48, 324-8.
- SUBRAMANIAM, D., THOMBRE, R., DHAR, A. & ANANT, S. (2014) DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Front Oncol*, 4, 80.
- TORNESELLO, M. L., LOSITO, S., BENINCASA, G., FULCINITI, F., BOTTI, G., GREGGI, S., BUONAGURO, L. & BUONAGURO, F. M. (2011) Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*, 121, 32-42.
- VIRMANI, A. K., MULLER, C., RATHI, A., ZOECHBAUER-MUELLER, S., MATHIS, M. & GAZDAR, A. F. (2001) Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res*, 7, 584-9.
- WENTZENSEN, N., SHERMAN, M. E., SCHIFFMAN, M. & WANG, S. S. (2009) Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science. *Gynecol Oncol*, 112, 293-9.
- YANG, H. J. (2013) Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chin J Cancer*, 32, 42-8.
- YANG, H. J., LIU, V. W., WANG, Y., CHAN, K. Y., TSANG, P. C., KHOO, U. S., CHEUNG, A. N. & NGAN, H. Y. (2004) Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol*, 93, 435-40.
- YIM, E. K. & PARK, J. S. (2005) The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer Res Treat*, 37, 319-24.
- ZACAPALA-GOMEZ, A. E., DEL MORAL-HERNANDEZ, O., VILLEGAS-SEPULVEDA, N., HIDALGO-MIRANDA, A., ROMERO-CORDOBA, S. L., BELTRAN-ANAYA, F. O., LEYVA-VAZQUEZ, M. A., ALARCON-ROMERO LDEL, C. & ILLADES-AGUIAR, B. (2015) Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 488, 187-95.
- ZEHBE, I., RICHARD, C., DECARLO, C. A., SHAI, A., LAMBERT, P. F., LICHTIG, H., TOMMASINO, M. & SHERMAN, L. (2009) Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*, 383, 69-77.
- ZUR HAUSEN, H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384, 260-5.



**Figura 1. Efecto de E6 de variantes del VPH-16 en la expresión de DNA metiltransferasas.** Expresión relativa de las DNA metiltransferasas (A) DNMT1, (B) DNMT3A y (C) DNMT3B en células C33-A transfectadas con E6 E-Prototipo y E6 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c de VPH16.

<b>Cuadro 1. Estado de metilación de genes supresores de tumor en C33-A transfectada con E6 de E-Prototipo y variantes del VPH16.</b>				
<b>Variante de E6 del VPH16 transfectada en C33-A</b>	<b>Estado de Metilación del promotor de los genes:</b>			
	<b>RAR<math>\beta</math></b>	<b>THBS1</b>	<b>CALCA</b>	<b>CDKN2A</b>
E-Prototipo	No Metilado	No Metilado	Metilado	Metilado
E-G350	No Metilado	No Metilado	Metilado	Metilado
AA-a	No Metilado	No Metilado	Metilado	Metilado
AA-c	No Metilado	No Metilado	Metilado	Metilado



## Discusión

Actualmente existe un amplio grupo de técnicas enfocadas en la detección del VPH en muestras citológicas e histológicas, algunos ensayos se han basado en amplificación de señal a nivel molecular, otros más en marcadores celulares (Zaravinos et al., 2009), sumado a lo anterior, se ha puesto de manifiesto que la integración viral al genoma celular es un evento frecuente en LEIAG y el CaCU (Matovina et al., 2009, Rousseau et al., 2007).

Existen algunos estudios que han comparado técnicas moleculares y citológicas para la detección de VPH-AR (Biedermann et al., 2004, Graf et al., 2000) y algunos otros se han enfocado en comparar técnicas de integración viral (Fujii et al., 2005, Gao et al., 2013, Hopman et al., 2005), sin que hasta ahora exista una técnica que determine la integración viral con una certeza del 100%, debido a esto, este trabajo se enfocó en determinar la concordancia entre las técnicas HIS, proporción E6/E2 del VPH16/18 determinada por PCR en tiempo real y metilación del gen L1 de estos genotipos virales para determinar el estado físico de estos tipos virales.

Los resultados obtenidos, indican claramente que al menos por dos de las tres técnicas utilizadas para determinar integración (HIS y metilación en L1) se observa una disminución en el porcentaje de muestras que presentan al virus en su estado episomal y un incremento en la integración de acuerdo al grado de lesión cervical y los casos de carcinoma estudiados, en el caso de la PCR en tiempo real, los resultados no presentan una tendencia definida en relación al estado físico con el diagnóstico (resultados mostrados en la tabla 1 del capítulo 1).

De manera general, los datos obtenidos concuerdan con reportes previos del aumento de integración viral en lesiones de alto grado y cáncer en relación con aquellas muestras de citología normal y/o lesiones de bajo grado que presentan infección con VPH16/18, del mismo modo, se observó el incremento de la metilación en el VPH16/18 como en otros reportes (Brandsma et al., 2009, Oka et al., 2013). En el caso de los resultados con tiempo real, tienen diferencia con lo reportado en otros estudios (Canadas et al., 2010).

Con respecto al análisis de concordancia, podemos observar que las tres técnicas pueden ser útiles en la determinación de integración viral, si consideramos que los porcentajes de concordancia entre técnicas fueron de 75% y 95.4% para PCR en tiempo real-Metilación de L1 y PCR en tiempo real-Hibridación *in situ* respectivamente (tabla 2 del capítulo 1). Algunos estudios han intentado realizar análisis de comparación entre diferentes técnicas para la detección de VPH (Biedermann et al., 2004, Graf et al., 2000) y de integración viral (Fujii et al., 2005, Gao et al., 2013, Hopman et al., 2005), la diferencia del presente estudio con otros realizados, es el hecho de comparar muestras de los diferentes grados de lesión citológica (citología normal con infección, lesión escamosa de bajo grado, lesión escamosa de alto grado y cáncer) por tres diferentes técnicas y no sólo de dos como se había analizado en los estudios previos mencionados.

Además, un punto interesante de enfoque realizado en el presente trabajo fue valorar la importancia de determinar la metilación sitio específica en el gen L1, si bien, algunos autores lo han sugerido previamente (Lorincz et al., 2013, Mirabello et al., 2013), solo Louvanto y colaboradores se centraron en dos sitios CpG específicos situados en el gen L1 (Louvanto et al., 2015). Con los resultados obtenidos en este estudio se propone a los sitios 5608 y 5617 como los más importantes en el pronóstico del desarrollo de cáncer, al presentar los OR con significancia estadística (figura 2a del capítulo 1). Con esta información, hasta ahora, se propone la realización de PCR sensible a metilación para valorar la metilación solamente en estos sitios CpG y establecer un pronóstico de integración viral.

La segunda parte del trabajo se enfocó en valorar el efecto que tiene E6 de las variantes E-G350, AA-a y AA-c del VPH16 en la expresión de DNA metiltransferasas y la modificación de la metilación en promotores de genes supresores de tumor. Con el antecedente previo de la capacidad que tienen las variantes de E6 de regular tanto positiva como negativamente la expresión de genes (Zacapala-Gomez et al., 2015) y del VPH de alto riesgo de alterar la metilación de una gran cantidad de genes (Leonard et al., 2012), se evaluó la expresión de DNA metiltransferasas y la metilación en genes supresores en RNA y DNA de células C-33A transfectadas establemente con E6 de diferentes variantes del VPH16.

En la primera parte de este análisis, se valoró la expresión de las tres DNA metiltransferasas más importantes en la regulación epigenética (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) mediante PCR en tiempo real de RNA de células C-33A transfectadas establemente con E6 Prototipo y de las variantes E-G350, AA-a y AA-c del VPH16 obtenidas en un estudio previo (Zacapala-Gomez et al., 2015). Para el caso de DNMT1 se observó una ligera disminución de su expresión en presencia de las tres variantes de E6 al ser comparadas con E6 Prototipo, siendo esta disminución estadísticamente significativa en presencia de E6 E-G350 y AA-c (Figura 1.a capítulo 2), este resultado puede ser un factor que esté involucrado en la regulación de la metilación presente en cáncer, debido a que, de manera general existe un estado de hipometilación global en la mayoría de los cánceres humanos (Esteller, 2005); aunque particularmente se ha visto incrementado el nivel de DNMT1 en cáncer, con metodologías de valoración diferente a la utilizada en el presente estudio (Sawada et al., 2007).

En lo referente a DNMT3A, la expresión se encontró disminuida con la presencia de la variante AAc en referencia a E6 Prototipo, mientras que en presencia de E6 variante AA-a se observó un ligero incremento sin llegar a ser este cambio estadísticamente significativo (Figura 1.b capítulo 2). Los niveles de DNMT3A previamente han sido evaluados sin llegar a tener una expresión diferencial marcada en presencia del VPH16/18 (Leonard et al., 2012).

Para el caso de DNMT3B, existió una disminución significativa cuando las células fueron transfectadas con la E6 variante AA-c (Figura 1.c capítulo 2), se ha reportado que los niveles de DNMT3B se incrementan en cáncer en comparación de cuando es medida en muestras sin cáncer (Luczak et al., 2012), además, en la infección con VPH-AR, al valorarse por inmunohistoquímica se observa un incremento de esta proteína (Leonard et al., 2012), cabe señalar que E6 de la variante AA-c fue la oncoproteína que alteró el mayor número de genes al ser transfectada en C-33A (Zacapala-Gomez et al., 2015), por lo que es probable que tanto DNMT1 como DNMT3B presenten expresión diferente al realizar este análisis.

En el análisis de expresión de genes en las células transfectadas con E6 de las diferentes variantes del VPH16 se observó desregulación transcripcional en un

gran número de ellos, dentro de los cuales se localizan varios involucrados en procesos claves relacionados con cáncer (Zacapala-Gomez et al., 2015), entre estos se eligieron dos genes, *THBS1* y *RARB* los cuales se ha reportado son regulados vía metilación (Li et al., 1999; Widschwendter et al., 2000); y de los genes *CALCA* y *CDKN2A*, de los cuales se tiene el reporte de que su metilación incrementa con la presencia de VPH-AR (Leonard et al., 2012). Se evaluó si la metilación era diferente de acuerdo al tipo de variante de E6 transfectada en las células C-33A. Respecto a esto, no se observaron cambios del estado de metilación (Cuadro 1 capítulo dos), lo que es un indicador de que la metilación en estos genes no es regulada a través de E6, y si existe una desregulación de dos de los cuatro genes evaluados, dicha desregulación no es ocasionada por la metilación de su promotor, o al menos no de la región que fue analizada esta ocasión.

## Referencias

- Amarante, M. K. & Watanabe, M. A. (2009) The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135, 329-37.
- Au Yeung, C. L., Tsang, W. P., Tsang, T. Y., Co, N. N., Yau, P. L. & Kwok, T. T. (2010) HPV-16 E6 upregulation of DNMT1 through repression of tumor suppressor p53. *Oncol Rep*, 24, 1599-604.
- Bernard, H. U., Calleja-Macias, I. E. & Dunn, S. T. (2006) Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*, 118, 1071-6.
- Biedermann, K., Dandachi, N., Trattner, M., Vogl, G., Doppelmayr, H., More, E., Staudach, A., Dietze, O. & Hauser-Kronberger, C. (2004) Comparison of real-time PCR signal-amplified in situ hybridization and conventional PCR for detection and quantification of human papillomavirus in archival cervical cancer tissue. *J Clin Microbiol*, 42, 3758-65.
- Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21.
- Bodily, J. & Laimins, L. A. (2011) Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends Microbiol*, 19, 33-9.
- Boyer, S. N., Wazer, D. E. & Band, V. (1996) E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 56, 4620-4.
- Brandsma, J. L., Sun, Y., Lizardi, P. M., Tuck, D. P., Zelterman, D., Haines, G. K., 3RD, Martel, M., Harigopal, M., Schofield, K. & Neapolitano, M. (2009) Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology*, 389, 100-7.
- Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Huh, J., Ortiz-Lopez, R., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J. F., Williamson, A. L., Hagmar, B., Wiley, D. J., Villarreal, L., Bernard, H. U. & Barrera-Saldaña, H. A. (2004) Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants. *Virology*, 319, 315-23.
- Cañadas, M. P., Darwich, L., Sirera, G., Cirigliano, V., Bofill, M., Clotet, B. & Videla, S. (2010) New molecular method for the detection of human papillomavirus type 16 integration. *Clin Microbiol Infect*, 16, 836-42.
- Casas, L., Galván C, S., Ordoñez M, R., López, N., Guido, M. & Berumen, J. (1999) Asian-American Variants Of Human Papillomavirus Type 16 Have Extensive Mutations In The E2 Gene And Are Highly Amplified In Cervical Carcinomas. *Int. J. Cancer*, 83, 449-455.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M. & Clifford, G. M. (2012) Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*, 86, 6855-61.
- Chavaro Vicuña, N., Arroyo Hernández, G., Felipe Álcazar, L., Muruchi Garrón, G. W. & Pérez Zuñiga, I. (2009) Cáncer cervicouterino. *Anales de Radiología México*, 1, 61-79.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & Zur Hausen, H. (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- Esteller, M. (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45, 629-56.

- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- Fujii, T., Masumoto, N., Saito, M., Hirao, N., Niimi, S., Mukai, M., Ono, A., Hayashi, S., Kubushiro, K., Sakai, E., Tsukazaki, K. & Nozawa, S. (2005) Comparison between in situ hybridization and real-time PCR technique as a means of detecting the integrated form of human papillomavirus 16 in cervical neoplasia. *Diagn Mol Pathol*, 14, 103-8.
- Ganguly, N. & Parihar, S. P. (2009) Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*, 34, 113-23.
- Gao, G., Chernock, R. D., Gay, H. A., Thorstad, W. L., Zhang, T. R., Wang, H., Ma, X. J., Luo, Y., Lewis, J. S., JR. & Wang, X. (2013) A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. *Int J Cancer*, 132, 882-90.
- Graf, A. H., Cheung, A. L., Hauser-Kornberger, C., Dandachi, N., Tubbs, R. R., Dietze, O. & Hacker, G. W. (2000) Clinical relevance of HPV 16/18 testing methods in cervical squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8, 300-9.
- Hopman, A. H., Kamps, M. A., Smedts, F., Speel, E. J., Herrington, C. S. & Ramaekers, F. C. (2005) HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer*, 115, 419-28.
- Hsu, C. H., Peng, K. L., Jhang, H. C., Lin, C. H., Wu, S. Y., Chiang, C. M., Lee, S. C., Yu, W. C. & Juan, L. J. (2012) The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. *Oncogene*, 31, 2335-49.
- Jeon, S. & Lambert, P. F. (1995) Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1654-8.
- Leonard, S. M., Wei, W., Collins, S. I., Pereira, M., Diyaf, A., Constandinou-Williams, C., Young, L. S., Roberts, S. & Wodman, C. B. (2012) Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes which parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*, 33, 1286-93.
- Lizano, M., Berumen, J. & García-Carranca, A. (2009) HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res*, 40, 428-34.
- Lorincz, A. T., Brentnall, A. R., Vasiljevic, N., Scibior-Bentkowska, D., Castañón, A., Fiander, A., Powell, N., Tristram, A., Cuzick, J. & Sasieni, P. (2013) HPV16 L1 and L2 DNA methylation predicts high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with mildly abnormal cervical cytology. *Int J Cancer*, 133, 637-44.
- Louvanto, K., Franco, E. L., Ramanakumar, A. V., Vasiljevic, N., Scibior-Bentkowska, D., Koushik, A., Cuzick, J., Coutlee, F. & Lorincz, A. T. (2015) Methylation of viral and host genes and severity of cervical lesions associated with human papillomavirus type 16. *Int J Cancer*, 136, E638-45.
- Luczak, M. W., Roszak, A., Pawlik, P., Kedzia, H., Kedzia, W., Malkowska-Walczak, B., Lianeri, M. & Jagodzinski, P. P. (2012) Transcriptional analysis of CXCR4, DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 gene expression in primary advanced uterine cervical carcinoma. *Int J Oncol*, 40, 860-6.
- Matovina, M., Sabol, I., Grubisic, G., Gasperov, N. M. & Grce, M. (2009) Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol Oncol*, 113, 120-7.
- Mirabello, L., Schiffman, M., Ghosh, A., Rodriguez, A. C., Vasiljevic, N., Wentzensen, N., Herrero, R., Hildesheim, A., Wacholder, S., Scibior-Bentkowska, D., Burk, R. D. &

- Lorincz, A. T. (2013) Elevated methylation of HPV16 DNA is associated with the development of high grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 132, 1412-22.
- Oka, N., Kajita, M., Nishimura, R., Ohbayashi, C. & Sudo, T. (2013) L1 gene methylation in high-risk human papillomaviruses for the prognosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*, 23, 235-43.
- Ortiz-Ortiz, J., Alarcon-Romero LDEL, C., Jimenez-Lopez, M. A., Garzon-Barrientos, V. H., Calleja-Macias, I., Barrera-Saldaña, H. A., Leyva-Vazquez, M. A. & Illades-Aguiar, B. (2015) Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virology*, 12, 29.
- Romanczuk, H. & Howley, P. M. (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3159-63.
- Rousseau, M. N., Costes, V., Konate, I., Nagot, N., Foulongne, V., Ouedraogo, A., Van de Perre, P., Mayaud, P. & Segondy, M. (2007) Viral load and genomic integration of HPV 16 in cervical samples from HIV-1-infected and uninfected women in Burkina Faso. *J Med Virol*, 79, 766-70.
- Sawada, M., Kanai, Y., Arai, E., Ushijima, S., Ojima, H. & Hirohashi, S. (2007) Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett*, 251, 211-9.
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P. E. & Burk, R. D. (2010) A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*, 70, 3159-69.
- Yamada, T., Wheeler, C. M., Halpern, A. L., Stewart, A. C., Hildesheim, A. & Jenison, S. A. (1995) Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol*, 69, 7743-53.
- Zacapala-Gomez, A. E., Del Moral-Hernandez, O., Villegas-Sepulveda, N., Hidalgo-Miranda, A., Romero-Cordoba, S. L., Beltran-Anaya, F. O., Leyva-Vazquez, M. A., Alarcon-Romero LDEL, C. & Illades-Aguiar, B. (2015) Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. *Virology*, 488, 187-95.
- Zaravinos, A., Mammas, I. N., Sourvinos, G. & Spandidos, D. A. (2009) Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*, 24, 215-22.