



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LA METILACIÓN DEL DNA
DE HPV 16 EN LA REGIÓN *L2/L1*,
MEDIANTE AMPLIFICACIÓN/SUPRESIÓN
SELECTIVA DE LA PCR POR *HEADLOOPS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

**CRISTIAN PABLO
MIGUEZ MUÑOZ**

Tutor: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ



MÉXICO, D. F.

Marzo 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Análisis de la Metilación del DNA de HPV 16 en la región *L2/L1*, mediante Amplificación/Supresión selectiva de la PCR por *Headloops*

Comité Tutoral

Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. María Alicia González Manjarrez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Jurado Asignado

Presidente	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Dra. Martha Verónica Vázquez Laslop	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Marcela Lizano Soberón	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dra. Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

El presente trabajo se desarrolló en:

Laboratorio de Virus y Cáncer
Instituto Nacional de Cancerología, SSA

Asesor del Tema



DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

Sustentante



CRISTIAN PABLO MIGUEZ MUÑOZ

A mis padres.

Este trabajo resume y hace patente
su empeño y apoyo de tantos años

A quienes han sucumbido
ante esta enfermedad.

Cuente esto como cumplida forma
de cobrarle una parte de la justa venganza

Al futuro. Con la esperanza
cierta de que ya allí,
la Luz Venció a las Tinieblas

Agradecimientos

A mi Buen Señor Dios, por la vida, el amor y los honores inmerecidos, por este mundo infinitamente interesante donde nuestras mentes pueden retozar y nuestros espíritus batallar.

A mis papás, por ayudarme a ser lo que soy y acompañarme hasta este punto del camino. Por siempre hacer patente su apoyo y amor inagotables, mucho más allá de lo que el deber exigiría y en grado por demás heroico. Los amo.

A toda mi familia y amigos, y a quienes ya se nos adelantaron. También en su nombre se libra esta batalla.

Al Dr. Alejandro, por todo el apoyo durante estos, tantos y tantos años; por aceptarme nuevamente como su alumno, pero sobre todo, por esa amistad que ya de tiempo atrás venía y que ha tenido a bien acrecentarse durante esta nueva etapa.

A todos en el labo: Miriam, Silvia, Lupita, Martha, Gaby, Samantha, José Luis, Paty, Anaís, Pedro, Jorge, Wendy, Jackie, Sofía, Veverly, Blanquita. Muy especialmente a Rocio, por el apoyo incondicional, los consejos, la amistad, los desayunos, comidas, y hasta por los regaños. Danke, Mutter!

A todos en el laboratorio del Dr. Dueñas, por hacer tan agradable esta transición a la vida laboral. Muy especialmente a Lucy, por su apoyo para llevar a buen término todos los trámites asociados con la conclusión de esta etapa.

A los buenos amigos del Deutsch: Mía, Abril, Paulina, Marzosol, Juan Carlos, por su sutil pero siempre agradable compañía durante este último tramo de la maestría.

A los amigos de ARMA, por ayudarme, a punta de espada (de forma un tanto literal), a ejercitar el espíritu beligerante tan necesario en empresas de este calibre.

A Irasema, por su sonrisa de luz en tiempos de oscuridad.

A mis cotutoras, la Dra. Alicia González y la Dra. Martha Vázquez, por su guía, sus acertados consejos, su paciencia y por hacer siempre agradables los exámenes tutorales.

A los integrantes de mi jurado, por sus atinadas observaciones que contribuyeron a hacer este trabajo mucho mejor de lo que mis propios medios me hubiesen permitido.

A CONACyT y DGEP UNAM, por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

A Huheey, mi compañero de vida, estudios y desveladas, cómplice y amigo incondicional, quien, a pesar de todas las amenazas, al final sí se ganó este agradecimiento en mi tesis. Ojalá pudieses verla ahora. Te extraño. "I'll see you again when the stars fall from the sky and the moon has turned red [...]".

A Paul Hewson, David Evans, Larry Mullen y Adam Clayton, por su sabiduría, su compañía en las buenas y en las malas, la inspiración en todo momento de la vida, y hasta por algún acertado epígrafe para la tesis y otros tantos para la vida.

A todos quienes deberían estar aquí y que, generalmente por descuido, o en los menos de los casos, prudencia, he omitido.

Muy especialmente a Monseñor Philippe, inagotable fuente de sabiduría, amistad y amor fraterno.

A mis hermanitos... En la Tierra...

«Hay tantas muertes como personas –respondió-.
En realidad nadie aguarda la suya, aunque lo crea.
Sólo la acompaña y dispone.
[...] –Tu muerte viaja contigo desde siempre, y la mía conmigo...
cada cual lleva la suya a cuestas.
[...] –Dios nos da – añadió- una corta luz entre dos noches.»

ARTURO PÉREZ-REVERTE. "CORSARIOS DE LEVANTE". 2006

Índice

Índice	i
Índice de Figuras y Tablas	iii
Resumen	1
Abstract	4
Antecedentes.	7
Cáncer Cervicouterino	7
Epidemiología: HPV y Riesgo de Cáncer Cervicouterino	7
Clasificación Histológica	10
HPV en Cánceres no Ginecológicos y Cáncer Bucal	12
Virus del Papiloma Humano	14
Epigenética	24
Modificaciones Covalentes de las Histonas	25
Metilación/Desmetilación del DNA	29
Metilación Aberrante del DNA en Cáncer	35
Control Epigenético en el HPV 16	38
PCR Específica para Metilación (MS-PCR)	45
Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloops</i>	47
Justificación	50
Objetivo	52
Hipótesis	53
Material y Métodos	54
Amplificación, Clonación y Secuenciación de la Región <i>L2/L1</i> de HPV 16.	54
Análisis Mediante Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloop</i>	58
DNA Polimerasas	59
Temperatura de Hibridación (T_m)	60
Concentración de Iones Mg^{2+}	60
Cantidad de DNA Blanco	60
Concentración del <i>Headloop</i>	60
Número de Ciclos de PCR	61
Sensibilidad de los <i>Headloops</i> 4M y 4U	61
Especificidad de los <i>Headloops</i> 4M y 4U	61
Metilación Mosaico	62

Metilación en Biopsias y Líneas Celulares	62
Tratamiento de Residuos de Bromuro de Etidio	62
Resultados	64
Obtención y Verificación de Moldes	64
Amplificación del Vector TOPO con el Inserto <i>L2/L1</i> (PCR de Colonias)	64
Condiciones que Afectan la Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloops</i> con Distinto Número de Sitios Metilados o no Metilados	66
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa Ofrece la Mejor Discriminación	66
La Temperatura de Hibridación (T_m) Afecta de de Manera Significativa el Desempeño de los <i>Headloops</i>	67
La Concentración Óptima de Iones Mg^{2+} es de 2 mM.	68
Cantidad de DNA Blanco	69
Concentración del <i>Headloop</i>	70
Número de Ciclos de PCR	71
Sensibilidad y Especificidad de los <i>Headloops</i> 4M y 4U	72
Sensibilidad	72
Especificidad	73
Metilación Mosaico	75
Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloops</i> en Biopsias y Líneas Celulares Derivadas de Cáncer Cervicouterino	77
Patrones de Metilación de <i>L2/L1</i> en Cáncer Bucal	79
Secuenciación de la Región <i>L2/L1</i> de HPV 16 en Muestras de Cáncer Bucal	79
Análisis <i>in silico</i> de <i>L2/L1</i> de Diversos Virus del Papiloma Humano	86
Los Dinucleótidos CpG en la Región <i>L2/L1</i> de Diferentes HPVs Están Conservados	86
Discusión	88
Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloops</i>	88
Patrones de Metilación en la Región <i>L2/L1</i> de HPV 16 en Muestras de Cáncer Oral	95
Región <i>L2/L1</i> : Epigenética y <i>Splicing</i> Alternativo, Ciclo Viral y Carcinogénesis	97
Conclusiones	113
Referencias	119

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Tasas de incidencia (por 100,000 habitantes) de cáncer cervical estandarizadas por edad	10
Figura 2. Precursores del carcinoma escamoso cervical	11
Figura 3. Mapa genómico del HPV 16	15
Figura 4. Diferenciación del epitelio mucoso escamoso normal y actividades de los papilomavirus en lesiones productivas benignas	20
Figura 5. Progresión de las alteraciones inducidas por el HPV	23
Figura 6. Estructura del nucleosoma	27
Figura 7. Mecanismo de metilación de la citosina en el carbono 5	30
Figura 8. Cambios en la expresión de genes virales en el ciclo de HPV 16 durante el desarrollo de cáncer cervical	43
Figura 9. Mecanismo de desaminación química de la desoxicitidina catalizada por bisulfito	45
Figura 10. Supresión de la PCR por <i>Headloop</i>	48
Figura 11. Diseño de oligonucleótidos <i>Headloop</i>	58
Figura 12. La región <i>L2/L1</i> se clonó con alta eficiencia en el vector TOPO TA (PCR de Colonias)	65
Figura 13. <i>Pfu</i> DNA polimerasa tiene el mejor desempeño en la amplificación/Supresión por <i>Headloops</i>	67
Figura 14. La T_m afecta significativamente la capacidad de Amplificación/Supresión de la PCR por <i>Headloops</i>	68
Figura 15. La concentración óptima de iones Mg^{2+} para los <i>Headloops</i> M y U es de 2.0 mM	69
Figura 16. Los <i>Headloops</i> 4M y 4U presentan buen desempeño con 50 ng de DNA blanco	70
Figura 17. La concentración óptima de los <i>Headloops</i> 4M y 4U es de 100 nM	71
Figura 18. Treinta ciclos de PCR proporcionan la Amplificación/Supresión óptimas	71
Figura 19. La sensibilidad de los <i>Headloops</i> 4M y 4U disminuye en presencia de DNA diferente a la secuencia blanco	73

Figura 20. Los <i>Headloops</i> 4M y 4U pueden detectar 1 copia de secuencia blanco en un fondo de 100 copias de secuencia competencia	74
Figura 21. El efecto de la metilación mosaico sobre el desempeño de los <i>Headloops</i> es altamente dependiente del contexto de los desapareamientos	75
Figura 22. La metilación en los sitios CpG 5602, 5608, 5611 y 5617 incrementa conforme las lesiones evolucionan hacia cáncer cervicouterino	78
Figura 23. Electroferogramas representativos de la región <i>L2/L1</i> en diferentes clones	80
Figura 24. Los dinucleótidos CpG y la señal de splicing AG están conservados en la región <i>L2/L1</i> de diversos HPVs	87
Figura 25. Sitio consenso de unión de E2	97
Figura 26. Región <i>L2/L1</i> con anotaciones	98
Figura 27. Diagrama esquemático de transcritos tardíos de HPV 16 identificados en células W12	99
Tabla 1. Funciones asignadas a los marcos abiertos de lectura (ORFs) de HPV 16	18
Tabla 2. Oligonucleótidos	59
Tabla 3. Resumen de patrones de metilación en la región <i>L2/L1</i> de HPV 16 en muestras de cáncer bucal	84
Tabla 4. Resumen de los patrones de Metilación Mosaico identificados en biopsias de cáncer bucal	85

Palabras clave: Cáncer cervicouterino; HPV; Epigenética; Metilación del DNA; Oligonucleótidos *Headloop*; PCR



Resumen

“[...] Párate gozosamente y estudia las intenciones del oponente.

Ataca de forma que él intente alejarse de ti, yo honestamente
digo que ninguno se defiende sin peligro.”

HANKO DÖBRINGER. “FECHTBUCH COD.HS3227A”. 1389.

“[...] ‘¡Sébase ahora

si vences o mueres bregando conmigo!’

En la sala se alzaron fragores de guerra:

Se empuñaban con brío los claros escudos,

se hendían los yelmos; temblaba el umbral.”

ANÓNIMO ANGLOSAJÓN. “LA BATALLA DE FINNSBURH” (FRAGMENTO). S. X D. C.

El cáncer cervicouterino es la segunda malignidad más común de la mujer en nuestro país. Los agentes etiológicos son los virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo. De éstos, el más prevalente es el tipo 16, siendo el más frecuentemente encontrado en mujeres con citología normal, así como en los casos de cáncer cervicouterino.

La epigenética se refiere a la serie de mecanismos que regulan la expresión genética sin cambiar la secuencia del DNA, de forma heredable, reversible y dinámica. La única modificación epigenética del DNA de mamíferos, es la metilación de la citosina en el carbono 5, en el contexto de un dinucleótido 5'-CpG-3', que puede reprimir la expresión genética, bien impidiendo el acceso de factores de transcripción a sus secuencias blanco, o reclutando diversas proteínas que producen cambios en la estructura de la cromatina.

La metilación aberrante del DNA se ha asociado con la patogénesis y progresión de varios procesos carcinogénicos, incluido el cervicouterino. Diversos estudios han analizado el estado de metilación de los dinucleótidos CpG en HPV, en varias etapas del proceso carcinogénico. Hasta el momento, ningún estudio ha centrado su atención

específicamente en la región *L2/L1* de HPV 16, aunque dos estudios observaron que la metilación de los dinucleótidos CpG en la región 3' de *L1* de HPV 18 incrementa conforme aumenta el grado de las lesiones hacia cáncer, sugiriendo su posible aplicación como biomarcador de progresión.

La mayoría de los estudios de metilación emplean DNA tratado con bisulfito, el cual cataliza la desaminación de citosinas convirtiéndolas en uracilos, los que en subsecuentes análisis por PCR serán sustituidos por timinas. La metil-citocina, siendo resistente a la desaminación, permanecerá como citosina, permitiendo distinguirlas de las citosinas no metiladas. En virtud de estas diferencias se han desarrollado diversas estrategias basadas en el empleo de oligonucleótidos para el estudio de la metilación del DNA. Una de ellas es la amplificación selectiva de secuencias, metiladas o desmetiladas, mediante oligonucleótidos *Headloop*. Esta técnica depende de la capacidad de los *Headloops* para discriminar entre dos secuencias cercanamente emparentadas, amplificando cantidades mínimas de una, y suprimiendo la amplificación de la otra, incluso en presencia de un gran exceso de la última.

En el presente trabajo se empleó la técnica de Amplificación/Supresión selectiva de la PCR por *Headloops* para estudiar la metilación de los sitios CpG 5602, 5608, 5611 y 5617, localizados en la región *L2/L1* de HPV 16, y cómo el grado de metilación varía durante la evolución de las lesiones precursoras hacia cáncer cervicouterino. El mejor desempeño se obtiene empleando en la PCR una enzima de alta fidelidad que produzca extremos romos, tal como la *Pfu* DNA polimerasa. Para obtener una discriminación adecuada es necesaria la presencia de cuatro y en ciertas instancias, tres sitios CpG, pero dos sitios y un sitio no ofrecen una discriminación suficiente. El límite de detección es de hasta 0.1 ng de secuencia blanco, aunque en presencia de DNA diferente a la secuencia blanco (p.ej. DNA genómico), la sensibilidad se reduce hasta 10 ng. En cuanto a la especificidad, es posible detectar una copia de la secuencia blanco, en presencia de

100 copias de la secuencia no deseada, no obstante, se tiene el potencial de detectar hasta $1:10^6$ copias. La incorporación de sondas *Taqman* para un acercamiento de PCR en tiempo real promete mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de la técnica. La evaluación del efecto de patrones heterogéneos de metilación (metilación mosaico), demostró que el efecto desestabilizador de cada desapareamiento es altamente dependiente del contexto, por lo tanto, en cada *Headloop* debe prestarse atención en el diseño, optimización de condiciones de reacción e interpretación de resultados.

Como parte del proceso de estandarización, la región *L2/L1* de HPV 16 de biopsias de cancer oral fue clonada y secuenciada. Este análisis mostró la existencia de patrones de metilación distintos de los que se esperarían, en relación con el cáncer cervical, sugiriendo que las alteraciones epigenéticas asociadas con cada una de estas dos malignidades proceden en formas diferentes.

Un análisis preliminar *in silico* de la región *L2/L1* de 70 HPVs reveló la presencia de dinucleótidos CpG en muchos de ellos, antecediendo una señal AG aceptora de *splicing* conservada, que precede al codón de inicio de *L1*, sugiriendo un posible papel de la metilación del DNA en el control del *splicing* alternativo de las proteínas virales tardías, dada la asociación entre MeCP2 y elementos del *spliceosoma*.

La aplicación de la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* en la región *L2/L1* en biopsias de lesiones de diverso grado histológico y en líneas celulares reveló un incremento de la metilación paralelo al aumento del grado de las lesiones. Los resultados de este trabajo concuerdan con otros estudios recientes de los metilomas de HPV 16, validando la utilidad de los *Headloops* para el estudio de la metilación del DNA, tanto de genes virales como celulares, al igual que para el eventual desarrollo de biomarcadores de cáncer, y herramientas para el seguimiento/monitoreo de terapias epigenéticas.



Abstract

“[...] Stand joyfully and study
the opponent's intentions. Strike so that
he tries to step away from you, I say honestly
that no one defends without danger.”
HANKO DÖBRINGER. “FECHTBUCH COD.HS3227A”. 1389.

“[...] ‘Even now appointed here for you
which thing for yourself from me you will attain.’
Then was in the hall the tumult of carnage,
the round shield-board must in the hands of the bold,
the bone-helm burst -the planks of the fortress resounded-“
ANONYMOUS ANGLOSAXON. “THE BATTLE AT FINNSBURH” (FRAGMENT). XTH C A. D.

Cervical cancer is the second most common malignancy in Mexico. The ethiological agents are the so called high-risk Papillomaviruses (HPVs). Of these, the more prevalent one is the type 16, being the most frequently found in women with normal cytology, as well as in cases of cervical cancer.

Epigenetics refers to the series of mechanisms that regulate gene expression without changing the DNA sequence, in a heritable, reversible and dynamic way. The only known epigenetic modification to the DNA of mammals is the methylation of cytosine in the carbon 5, within the context of a 5'-CpG-3' dinucleotide, which can repress gene expression by preventing the access of transcription factors to their target sequences, or by recruiting diverse proteins that change the structure of chromatin.

DNA's aberrant methylation has been associated with the pathogenesis and progression of many carcinogenic processes, including cervical cancer. Some studies have analyzed

the methylation status of CpG dinucleotides in HPV throughout the many stages of the carcinogenic process. Up to now, none of them has specifically centered its attention in the *L2/L1* region of HPV 16, although two studies observed that the methylation of CpG dinucleotides in the 3' end of *L1* in HPV 18 increases as the grade of the lesions progresses towards cancer, suggesting its possible role as progression biomarker.

A great number of studies use DNA treated with bisulfite, which catalyzes the deamination of cytosines to convert them to uracils, which, in a subsequent PCR analysis, will be substituted by thymines. Methyl-cytosine, being resistant to deamination, remains as cytosine, allowing to distinguish it from methyl-cytosine. Due to these differences, many strategies have been developed to study DNA methylation, based on the use of oligonucleotides. One such approach is the selective amplification of methylated or unmethylated sequences by *Headloop* primers. This technique relies on the *Headloop*'s ability to discriminate between two closely related sequences, amplifying minute amounts of one, while suppressing the amplification of the other, even in the presence of a large excess of the later.

In the present study the Amplification/selective Suppression of PCR by *Headloops* was used to study the methylation of CpG sites 5602, 5608, 5611 y 5617, located in the *L2/L1* region of HPV 16, and how the degree of methylation changes throughout the evolution of precursor lesions towards cervical cancer. The best performance is achieved by using in PCR a high fidelity enzyme that produces blunt ends, such as the *Pfu* DNA polymerase. To obtain an adequate discrimination it is necessary the presence of four, and in some instances, three CpG sites, but two sites and one site do not offer enough discrimination. The detection limit is 0.1 ng, although the presence of DNA different from the target sequence (e. g. genomic DNA), lowers the sensibility to 10 ng. Regarding specificity, it is possible to detect one copy of the target sequence in a background of 100 copies of the unwanted sequence, though there is the potential to detect as few as 1:10⁶ copies. The

addition of *Taqman* probes for a real-time PCR approach promises to improve both the sensibility and specificity of the technique. The assesment of the effect of heterogeneous methylation patterns (mosaic methylation) showed that the destabilizing effect of each mismatch is highly context-dependent, thus, for every *Headloop* special care should be put in its design, optimization of reaction conditions, and interpretation of results.

As a part of the standarization process, the *L2/L1* region of HPV 16 from oral cancer biopsies was cloned and sequenced. This analysis showed the presence of methylation patterns different from those that would be expected, in relation to cervical cancer, suggesting that the epigenetic alterations associated with each of these malignancies proceed in different ways.

A preliminary *in silico* analysis of the *L2/L1* region of 70 HPVs showed the presence of CpG dinucleotides in many of them, preceeding a conserved AG splicing acceptor signal, upstream of *L1*'s start codon, suggesting a possible role of DNA methylation in controlling the alternative *splicing* of the late viral proteins, given the association of MeCP2 with elements of the *spliceosome*.

The use of the Amplification/PCR Suppression by *Headloops* technique in the *L2/L1* region of HPV 16 in biopsies of lesions of different histological grades and in cell lines demonstrated an increase in methylation which paralels that one of the lesion's grade. This results are in agreement with those of other recent studies of the HPV 16 methylome, validating the utility of *Headloops* to study DNA methylation, both of viral and cellular genes, as well as for the eventual development of cancer biomarkers, and follow-up/monitoring tools for epigenetic therapies.



Antecedentes

CÁNCER CERVICOUTERINO

“Es un goce de poca duración, en tanto que su castigo será doloroso.”

“EL CORÁN”. SURA XVI, 118

“La guerra [...] constituye la base de la vida y la muerte, es el camino que lleva a la supervivencia o a la aniquilación. Por ello es indispensable estudiarla a fondo.”

SUN TZU “EL ARTE DE LA GUERRA”, 500 A. C.

Epidemiología: HPV y Riesgo de Cáncer Cervicouterino

En 1842, en Italia, se reportó que el cáncer cervical se desarrollaba de forma casi exclusiva en mujeres casadas y que éste era muy raro en monjas, dando la primera pista que sugería que un agente de transmisión sexual estaba asociado con la patogénesis del cáncer cervicouterino (Psyrry y DiMaio, 2008). De igual forma, un estudio estadounidense realizado en 1968 encontró tasas más bajas de cáncer cervical en monjas (10.8%) que en mujeres control (56.6%) y atribuyó las diferencias a factores asociados con el coito (Fraumeni, *et al.*, 1969).

A diferencia de muchos tipos de cáncer, en los que múltiples factores ambientales, biológicos y de estilo de vida contribuyen independiente o conjuntamente con la carcinogénesis, se ha demostrado que el cáncer cervical tiene un elemento causante central, las infecciones persistentes con ciertos tipos del virus del papiloma humano (HPV), cuya contribución al riesgo para desarrollar esta enfermedad es mucho mayor que la de cualquier otro factor (Franco, 1999).

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el tercero más común entre las mujeres alrededor del mundo, con cerca de 400,000 nuevos casos diagnosticados por año (Lowy y Howley, 2001). La incidencia anual promedio de cáncer cervical invasivo es diferente en cada región geográfica pero las tasas más altas reportadas corresponden a América Latina (Brinton, 1992), de hecho, el cáncer cervical es considerado un tumor ligado a la pobreza (Cavalli, 2006).

La proporción de supervivencia a 5 años para el cáncer cervical en los Estados Unidos (es decir, la cantidad de pacientes que sobreviven por lo menos 5 años, en comparación con una población libre de cáncer) es de 68.3% para todas las etapas; 90.9% para el localizado; 49.9% cuando existe una diseminación local; y 8.6% cuando hay metástasis (Sci. Am. Editorial board, 1996), lo cual pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico y tratamiento tempranos. De hecho, las diferencias en la prevalencia y mortalidad entre países ricos y pobres puede atribuirse a estos dos factores (Cavalli, 2006).

La infección de los genitales por HPV es una de las más comunes enfermedades de transmisión sexual, alcanzando una prevalencia máxima entre mujeres jóvenes (15 a 25 años) sexualmente activas, que va de 20 a 46% en diferentes países (Ho *et al.*, 1998; Lowy, 2001), considerándose como factores de riesgo: relaciones sexuales antes de los 18 años; número de compañeros sexuales durante la vida; tabaquismo; y un bajo nivel socioeconómico (Sci. Am. Editorial board, 1996).

En particular, se ha demostrado en diversos estudios de casos y controles que las mujeres que tuvieron su primer experiencia sexual antes de los 16 años de edad muestran un riesgo para desarrollar CaCU de aproximadamente el doble que aquellas que iniciaron su vida sexual después de los 20 años. Este parámetro suele guardar una correlación con el número de compañeros sexuales, factor que juega un papel significativo en la etiología del cáncer cervical, habiendo estimados que sugieren que la proporción de nuevos casos que pueden atribuirse a tener 10 o más compañeros es

cercana a 36%, con un riesgo tres veces mayor que el asociado a tener 0 o 1 compañero. En este respecto, las características de los compañeros son importantes ya que las esposas de hombres antes casados con pacientes de cáncer cervical, presentan tasas más elevadas de este padecimiento en relación con controles. De igual manera, los esposos de mujeres afectadas reportan significativamente más compañeras y padecimientos de transmisión sexual (como verrugas genitales, gonorrea, herpes genital) que los esposos de mujeres control (Brinton, 1992).

Debido a las condiciones particulares de los países en vías de desarrollo, la incidencia de cáncer cervical es mayor que en Europa y Norteamérica (Villa *et al.*, 2000) (Figura 1), siendo el cáncer más común de la mujer, donde puede alcanzar una prevalencia de 25% de los mismos (Lowy, 2001). Este riesgo elevado se debe tanto a un mayor predominio de factores de riesgo, como a la falta de acceso a los sistemas de salud, en particular, al monitoreo de cáncer cervical por Papanicolau, o a un inadecuado seguimiento y tratamiento de las anomalías detectadas por esta técnica (Engelstad *et al.*, 2001) y se estima que sólo 5% de las mujeres en países en vías de desarrollo han sido monitoreadas por Papanicolau durante los cinco años anteriores. Por ejemplo, una iniciativa a nivel nacional en México falló en reducir las tasas de mortalidad, en parte porque las mujeres jóvenes de áreas urbanas fueron monitoreadas de forma repetida, mientras que otras muchas mujeres mayores no tuvieron acceso a la evaluación (Katz, 2006).

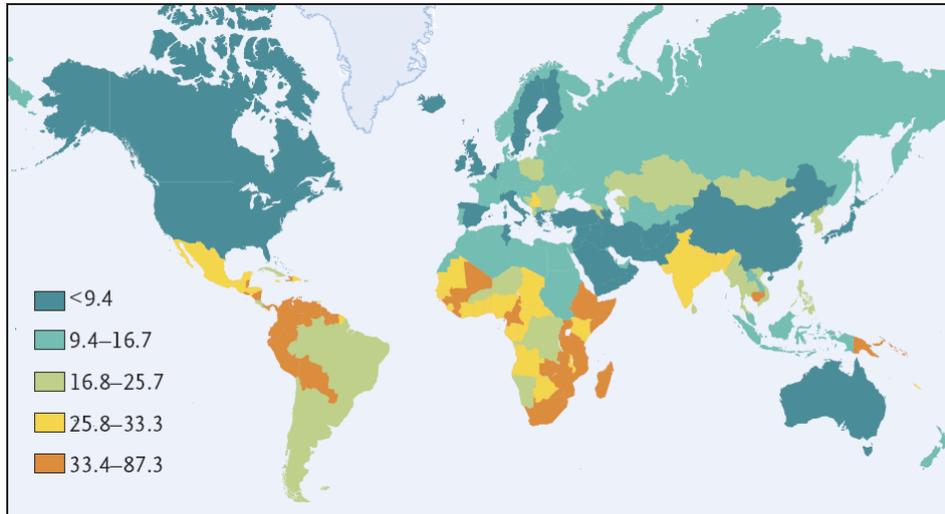


Figura 1. Tasas de incidencia (por 100,000 habitantes) de cáncer cervical estandarizadas por edad

(Tomado de Katz, 2006)

Adicionalmente, se ha demostrado que incluso en la población general de países con una baja tasa de incidencia (el Reino Unido) existe un amplio desconocimiento sobre el HPV como factor etiológico del cáncer cervicouterino, con sólo 2.5% de las mujeres entrevistadas mencionando al virus como causa de este tipo de cáncer. Quienes mencionaron al HPV en general poseían educación formal y un nivel socioeconómico más alto (Marlow, 2007).

Clasificación Histológica

La displasia cervical, también conocida como lesión escamosa intraepitelial (SIL por sus siglas en inglés) en citología, o neoplasia cervical intraepitelial (CIN) en histopatología, puede clasificarse en los grados I, II, y III. Este sistema de graduación asume que la severidad de la CIN representa un continuo morfológico y biológico de etapas progresivas que pueden llevar al desarrollo de un carcinoma escamoso invasivo (Ho *et al.*, 1995). La severidad de la lesión se determina de acuerdo con el grado en el cual el epitelio escamoso es reemplazado por células basaloideas (Lowy Howley, 2001) (Figura 2).

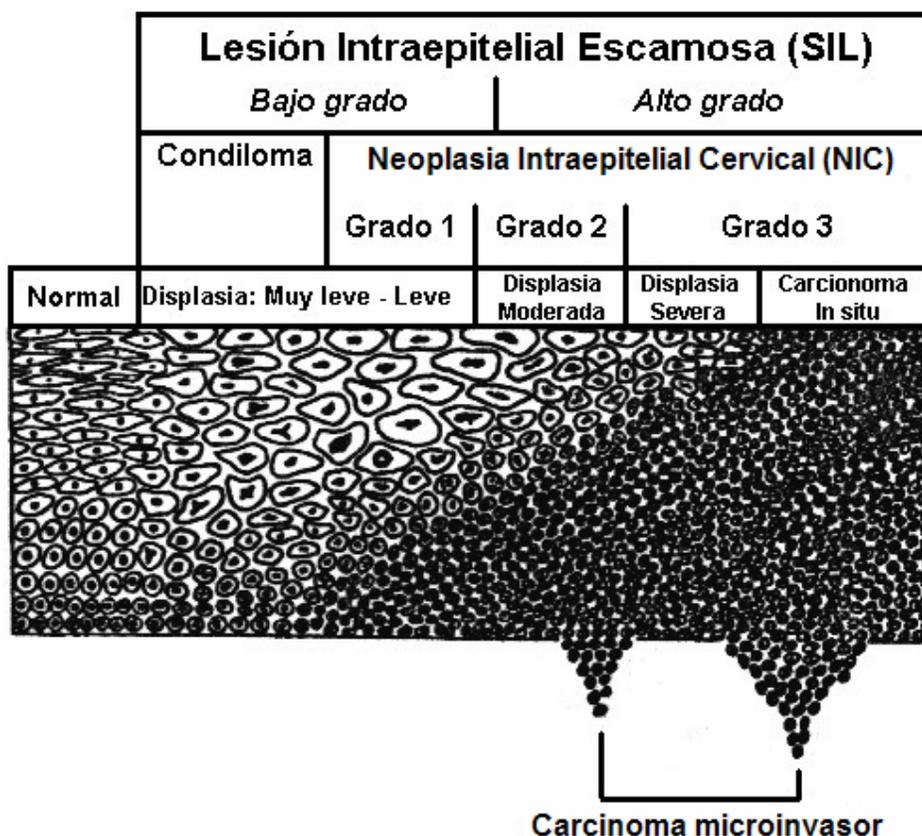


Figura 2. Precursores del carcinoma escamoso cervical

Representación esquemática de los diferentes estadios precursores del cáncer cervical y las terminologías usadas para referirse a ellos (adaptado de Lowy y Howley, 2001)

La mayoría de los cánceres ocurren en la zona de transformación del cérvix, donde las células columnares del endocérnix y el epitelio escamoso estratificado del exocérnix se traslapan. Debido a ello, cerca de 85% de los cánceres cervicales son cánceres de células escamosas, y la mayoría de los otros casos son adenocarcinomas, con un pequeño número de tumores neuroendócrinos de células pequeñas (Lowy y Howley, 2001).

A través de un gran número de estudios epidemiológicos se ha establecido que la displasia cervical es una lesión asociada con el HPV (Ho *et al.*, 1995; Hildesheim *et al.*, 1994), en particular con los tipos que, debido a su detección en los cánceres cervicouterinos, se les ha denominado “oncogénicos” o de alto riesgo (Villa *et al.*, 2000; Wallin *et al.*, 1999; Liaw *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 1998; zur Hausen, 1991; Kessis *et al.*,

1993). Debido a esto, se considera que la asociación entre la infección por HPV y el desarrollo de SIL es de tipo causal (Liaw *et al.*, 1999), reportándose detección de HPV en 99.7% de los cánceres cervicales (Woodman *et al.*, 2001).

Se ha observado una proporción de momios que va de 10 hasta más de 200 para la infección por HPV como factor de riesgo para las displasias y el cáncer cervical. Estas razones de momios son las más altas para un carcinógeno humano (Lowy, 2001).

HPV en Cánceres no Ginecológicos y Cáncer Bucal

En los carcinomas del cérvix se ha encontrado la presencia de HPV de alto riesgo en prácticamente 100% de los casos, aunque también se les ha detectado en otros tipos de cáncer, por ejemplo, en carcinomas anogenitales, vías aerodigestivas superiores y de pulmón, entre otros. Una revisión reciente de la literatura encontró estudios que ponen de manifiesto la presencia de HPV en un gran número de tumores de diversos tejidos: corazón (1 estudio); riñon (1 estudio); próstata (de 2 a 54%, media 22.9%); vejiga (0 a 40%, media 16%); estómago (< 15%); colon (0 a 97%, media 70%); hígado (19%); vagina/vulva (17 a 92%, media 51%); endometrio (0 a 44%, media 17%); ovario (0 a 52%, media 24%); mama (0 a 74%, media 22%); pene (42 a 82%, media 63%); ano (19 a 90%, media 59%); piel (18 a 83%, media 47%); pulmón (0 a 80%, media 25%); laringe (9 a 36%, media 22%); esófago (16 a 56%, media 34%); y cavidad bucal (24 a 74%, media 41%). Aunque en los estudios revisados se encontraron varios tipos de HPV, tanto de bajo como de alto riesgo, en la totalidad de los mismos se detectó la presencia de HPV 16. A pesar de estas tasas de detección, aún resta confirmar si estos virus guardan una relación causal con el proceso oncogénico de los tumores en donde se les ha identificado. No obstante, independientemente del tejido estudiado, se ha observado un mejor pronóstico cuando HPV está presente, pues en general existe una mayor sensibilidad a la radioterapia (Petersen y Klein, 2008).

En particular, la infección por HPV también ha sido asociada etiológicamente con un subgrupo de carcinomas de cabeza y cuello. Creciente evidencia epidemiológica, molecular y clínica indica que la presencia de HPV de alto riesgo (especialmente HPV 16) es responsable por el desarrollo de estas malignidades, especialmente en algunos individuos que no tienen los factores de riesgo clásicos (p. ej., consumo de tabaco o alcohol), con estudios que indican que la infección oral por HPV es de transmisión sexual y que revelan una asociación entre la conducta sexual y la incidencia de cáncer de cabeza y cuello, en especial, de cáncer orofaríngeo de células escamosas (Psyrrri y DiMaio, 2008).

Desde un punto de vista molecular, en los carcinomas asociados a HPV, p53 y pRb son nativos, con un incremento en la expresión de p16 (similar a lo observado en cáncer cervicouterino), mientras que en aquéllos asociados a tabaco/alcohol se observan mutaciones en p53 y disminución en los niveles de p16. Desde una perspectiva clínica, los cánceres positivos a HPV suelen tener mejor pronóstico que los negativos (con una reducción de 60 a 80% en el riesgo de mortalidad por cáncer), posiblemente debido a un origen más localizado de las lesiones, así como una mayor sensibilidad a la radiación y la quimioterapia (en virtud de la existencia de p53 nativo, la respuesta apoptótica podría estar aún intacta) (Psyrrri y DiMaio, 2008).

Diferentes estudios han reportado prevalencias de HPV en cáncer bucal que van de 3.9 a 74% (43.5% en un estudio en población mexicana). La asociación entre la infección por HPV de alto riesgo y el desarrollo de cáncer oral de células escamosas es fuerte, independientemente del tabaco o alcohol, con una razón de momios 6 veces mayor para el desarrollo de cáncer bucal, en relación con controles. Entre los virus de alto riesgo encontrados, HPV 16 es el más frecuentemente detectado (en 55.6% de los casos, vs. 34.9% en controles) (Anaya-Saavedra *et al.*, 2008), con reportes que indican su presencia hasta en 90% de los casos positivos para HPV (Psyrrri y DiMaio, 2008).



VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

“Natura nunquam magis et tota quam in minimis.”

(En ningún lugar se encuentra la naturaleza en su totalidad
tanto como en sus más pequeñas criaturas)

PLINIO, SIGLO I, D. C.

“Hay cosas que ningún hombre puede conquistar, y ninguna espada
puede matar, y ningún fuego puede quemar”

MICHAEL CRICHTON “EATERS OF THE DEAD”, 1976.

En 1933 Shope y Hurst reportaron el descubrimiento de un virus de conejos, el *Shope Papilloma virus*, que era capaz de producir papilomas benignos en conejos silvestres, pero cuando el extracto filtrable de las verrugas era usado para inocular conejos domésticos (una especie diferente), el virus producía carcinomas malignos. No obstante, no era posible aislar virus infecciosos a partir de tales carcinomas (debido a la integración del DNA viral en el del hospedero), lo que se convirtió en un paradigma en el campo de los oncovirus de DNA (Shope y Hurst, 1933; Levine, 2009).

Los papilomavirus son un grupo de virus epiteliotrópicos que producen lesiones benignas de la piel (verrugas) y las mucosas (condilomas), así como malignidades epiteliales (Lowy y Howley, 2001; White, 1994). Los HPVs pueden clasificarse de forma gruesa en tres grupos: tipos cutáneos, tipos EV, y tipos mucosa-genital. Los tipos cutáneos causan verrugas de la piel. Los tipos EV producen lesiones de la piel en individuos con epidermodisplasia verruciforme (EV) o inmunosuprimidos. Los tipos mucosa-genital pueden infectar la piel genital, la mucosa genital y mucosa no genital; éstos se subdividen en tipos de alto riesgo o bajo riesgo, dependiendo de si se encuentran regularmente o no, en el cáncer cervical (Lowy y Howley, 2001).

Estos virus se caracterizan por ser pequeños (aproximadamente 55 nm de diámetro), carecer de envoltura, y poseer una cápside icosaédrica. El genoma está conformado por DNA de doble cadena con cerca de 8,000 pares de bases (bp). La replicación y el ensamblaje de los viriones se realiza en el núcleo celular (Howley y Lowy, 2001).

La cadena codificante contiene, en general, 8 ORFs, los cuales, de acuerdo con su posición en el genoma, son clasificados como tempranos (E: *early*) o tardíos (L: *late*). La región temprana se expresa tanto en células infectadas de forma productiva, como en células transformadas, y codifica proteínas regulatorias, incluyendo las proteínas virales necesarias para dar inicio a la replicación del DNA viral. Por su parte, la región tardía consiste en dos ORFs, *L1* y *L2*, que codifican las proteínas de la cápside viral. Adicionalmente, existe una región de tamaño variable en la cual no hay ORFs pero que contiene elementos regulatorios en *cis*, tal como el origen de replicación, el promotor y el *enhancer*, por lo que es conocida como Región Larga de Control (LCR: *Long Control Region*) (Howley y Lowy, 2001) (Figura 3).

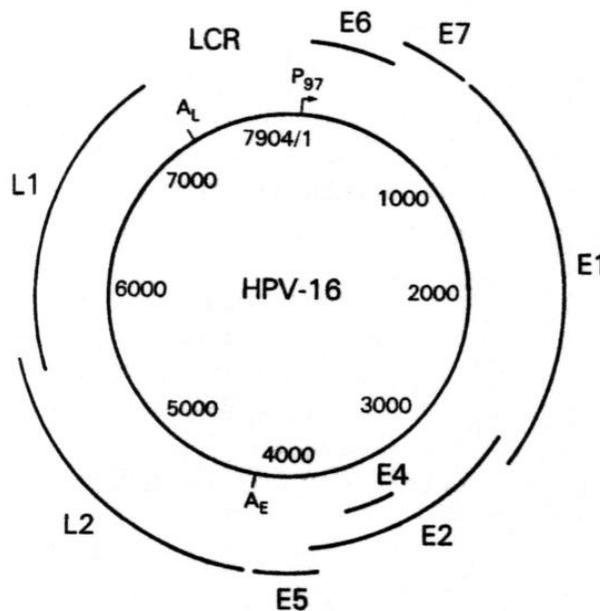


Figura 3. Mapa genómico del HPV 16

El genoma viral del HPV 16 es una molécula de DNA circular de 7904 bps. El promotor temprano de la transcripción es P₉₇, el tardío es P₆₇₀. Los ORFs (*E1* a *E7*, y *L1* y *L2*) están indicados. A_E y A_L representan los sitios de poliadenilación temprana y tardía, respectivamente (tomado de Lowy y Howley, 2001)

La transcripción de los HPVs es compleja debido a la presencia de patrones de *splicing* múltiples y alternativos, y a la producción diferencial de especies de mRNA en diferentes células. En células transformadas, estos mensajeros codifican principalmente factores virales involucrados en la replicación del plásmido viral, en la regulación de la transcripción viral y en la transformación celular (Howley y Lowy, 2001). Estas proteínas son capaces de inducir proliferación no programada y prevenir la apoptosis de las células infectadas, facilitando así la acumulación de mutaciones en el genoma del hospedero, lo que podría llevar a la activación de oncogenes celulares o a la inactivación de genes supresores de tumores (Tommasino *et al.*, 2003).

Los genes *E1* y *E2* codifican proteínas indispensables para la replicación extracromosómica del genoma viral episómico, que se unen de forma cooperativa en el origen de replicación viral (Berg y Stenlund, 1997), aunque *E1* es el único factor viral directamente involucrado en este proceso. *E1* es una fosfoproteína nuclear que se une específicamente al origen de replicación con baja afinidad, y es estabilizada mediante la interacción con *E2* (cuando ésta está ubicada en sus sitios de unión, adyacentes al origen de replicación). *E1* tiene actividades de ATPasa y de helicasa dependientes de DNA, necesarias para la iniciación y la elongación de la replicación. Adicionalmente, *E1* puede unirse a varias proteínas celulares, por ejemplo, la eficiente replicación del genoma viral, regulada por el ciclo celular, depende de la asociación de *E1* con el complejo ciclina E-CDK2 específico de la fase S (Howley y Lowy, 2001).

Las proteínas *E2* poseen dos dominios relativamente bien conservados entre los HPVs: un dominio que contiene la función de unión a DNA en forma secuencia-específica y la de dimerización (en la región carboxilo terminal), y otro dominio de transactivación (en el extremo amino terminal). Ambos se encuentran separados por una región bisagra interna que varía de un virus a otro. Las proteínas *E2* se unen como dímeros (Howley y Lowy, 2001) a la secuencia consenso ACCGN₄CGGT.

Se han reportado tres isoformas distintas de la proteína E2. Aquélla de tamaño completo (E2TA) puede funcionar como un transactivador o un represor, dependiendo de la ubicación de sus sitios de unión en relación con el promotor y el *enhancer*. En el caso del genoma del HPV 16 el promotor P₉₇, que dirige la expresión de E6 y E7, es reprimido por E2 cuando ésta ocupa los sitios de unión ubicados cerca de la caja TATA, probablemente por interferencia con el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción (Howley y Lowy, 2001).

En estudios de transformación de cultivos celulares primarios se demostró que los HPVs de alto riesgo son capaces de inducir la transformación celular, mientras que los virus de bajo riesgo no lo son. Estos ensayos permitieron determinar que los genes directamente involucrados con la transformación son los ORFs *E6* y *E7* (Howley y Lowy, 2001). La oncoproteína E6 de los virus de alto riesgo tiene un bajo potencial oncogénico por sí misma, y es necesaria la cooperación con E7 para dar lugar a una capacidad transformante completa. Estos efectos son producidos por la estimulación de la degradación de los supresores de tumores p53 y pRB mediada por E6 y E7, respectivamente (Dueñas-González *et al.*, 2005).

E6 interactúa con la proteína celular E6AP, la cual funciona como una ubiquitín-proteín-ligasa. El complejo E6/E6AP a su vez se une a la región central de p53 favoreciendo su rápida ubiquitinación y degradación en el proteasoma. Esto tiene como consecuencia la presencia de niveles extremadamente bajos de p53, y como éste juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad genómica, en estas células se observa inestabilidad cromosómica, lo que aumenta la probabilidad de evolución hacia la malignidad (Tommasino *et al.*, 2003). La proteína E6 de los HPVs de alto riesgo tiene la capacidad de unirse a p53 para estimular su degradación, mientras que esta misma proteína, en los virus de bajo riesgo, no se une a cantidades detectables de p53 (Howley y Lowy, 2001).

Por su parte, la unión de E7 a pRB libera al factor de transcripción E2F, favoreciendo así la expresión de genes que estimulan la síntesis de DNA en la célula (Dueñas-González *et al.*, 2005) y el paso de G₁ a S. La disminución de p53 mediada por E6 complementa a E7 previniendo la apoptosis en respuesta a la entrada no programada a la fase S inducida por la última (Doorbar, 2005).

El gen *E4* codifica una fosfoproteína citoplasmática cuya función biológica no se conoce con precisión, aunque se ha demostrado que genera despolimerización de citoqueratinas; E5 es una proteína que interactúa con receptores de factores de crecimiento para activarlos, y por lo tanto también es considerada como una oncoproteína; L1 es la principal proteína estructural de la cápside viral, compuesta por 72 pentámeros de ésta; L2 es menos abundante en la cápside, interactúa con los pentámeros de L1 y es necesaria para la encapsidación del genoma viral (Tabla 1) (Lowy y Howley, 2003).

Tabla 1. Funciones asignadas a los marcos abiertos de lectura (ORFs) de HPV 16

(Adaptado de Lowy y Howley, 2001)

ORF	Función
<i>L1</i>	Proteína L1, proteína principal de la cápside
<i>L2</i>	Proteína L2, proteína menor de la cápside
<i>E1</i>	Iniciación de la replicación del DNA viral
<i>E2</i>	Regulación transcripcional; papel auxiliar en la replicación del DNA viral
<i>E4</i>	Disrupción de polímeros de citoqueratinas
<i>E5</i>	Transformación de membrana; interacción con receptores de factores de crecimiento
<i>E6</i>	Transformación celular; marca a p53 para degradación
<i>E7</i>	Transformación celular; unión a la proteína retinoblastoma

Los papilomas son lesiones epiteliales benignas que aparecen tras un periodo de latencia que varía de semanas a meses, y pueden desarrollarse prácticamente en cualquier

epitelio escamoso estratificado, ya sea la piel o las mucosas. Estas lesiones pueden mantenerse durante meses o años y después revertir espontáneamente. A fin de establecer esta infección crónica, el virus debe infectar las células epiteliales con capacidad proliferativa a largo plazo, por lo que se postula que durante la inoculación es necesario un trauma menor a las capas superiores del epitelio (que puede ocurrir durante el coito) el cual brinde acceso a la capa celular basal, donde se encuentran las células proliferativas (Lowy y Howley, 2001).

En las infecciones productivas el DNA viral es amplificado como un plásmido extracromosómico (episomal) en células postmitóticas diferenciadas localizadas en el estrato suprabasal. En estas células, es común que no existan, o que se expresen en niveles muy bajos, las oncoproteínas E6 y E7, debido al control negativo impuesto sobre el *enhancer*-promotor (en la LCR) por los factores celulares de transcripción y posiblemente por la proteína E2 (Van Tine *et al.*, 2004).

Las capas inferiores de la epidermis albergan un bajo número de copias de DNA viral, así como bajos niveles de transcrito viral. La replicación vegetativa del DNA, la expresión de las proteínas y el ensamblaje de los virus se dan en las capas superiores (diferenciación terminal). El ensamblaje de los virus ocurre en el núcleo, donde los viriones suelen permanecer hasta que las células son descamadas (Figura 4) (Lowy y Howley, 2001).

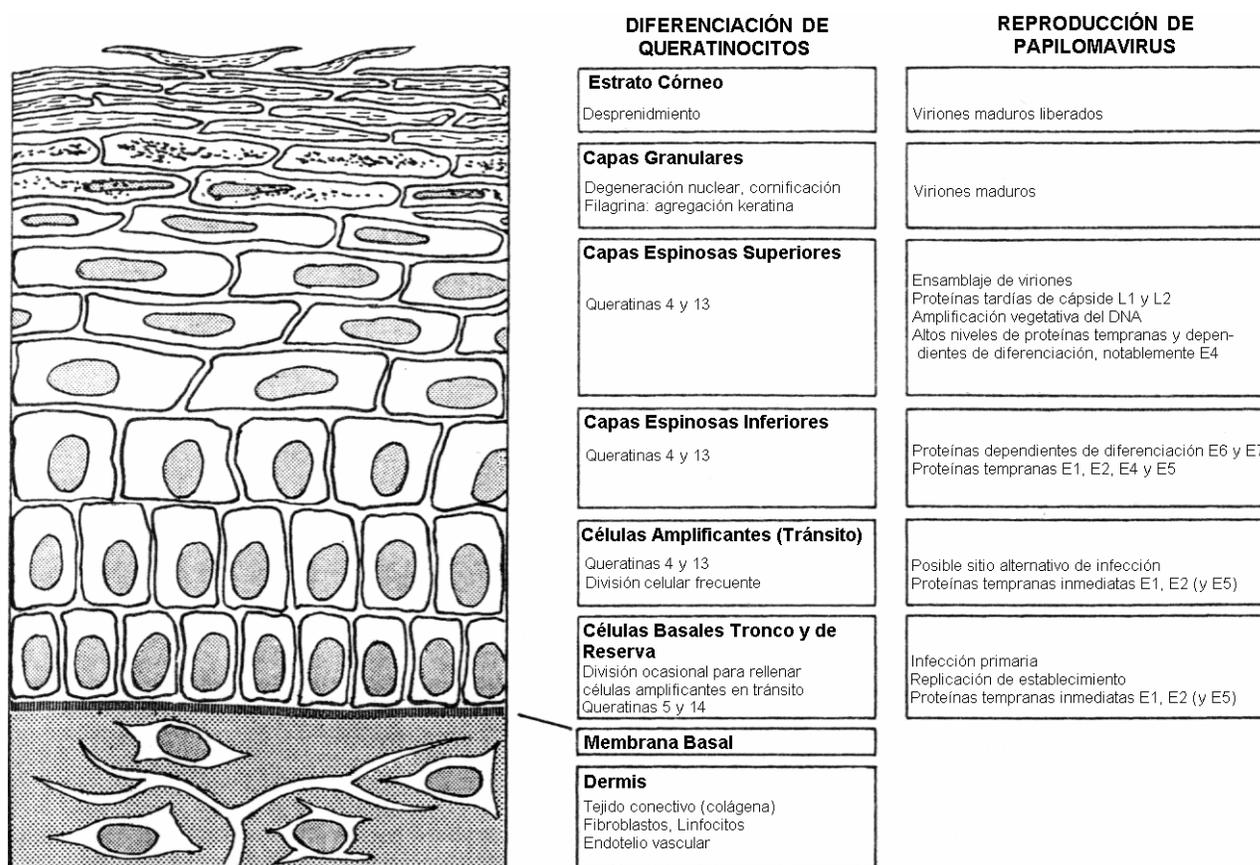


Figura 4. Diferenciación del epitelio mucoso escamoso normal y actividades de los papilomavirus en lesiones productivas benignas

Los estratos epiteliales y su diferenciación, así como el perfil de expresión genética, se muestran en los paneles de la izquierda y el centro. Las capas granulares y el estrato córneo no existen en el epitelio no queratinizado, como es el caso del cervical. En el panel de la derecha se muestran las actividades virales en cada estrato (adaptado de Howley y Lowy, 2001).

Los cánceres atribuibles a la infección por HPV ocurren después de muchos años de la infección inicial, la cual, tradicionalmente genera papilomas displasias leves (SIL de bajo grado) (Lowy y Howley, 2001). De hecho, se estima que el periodo de latencia entre la infección inicial y el desarrollo de cáncer es de alrededor de 10 años (Psyrry y DiMaio, 2008).

El riesgo de desarrollar una SIL de alto grado se asocia con la presencia de los tipos de alto riesgo, de los cuales, el más frecuentemente detectado es el HPV 16, y cuya detección repetida se ha asociado con un riesgo particularmente alto de progresión hacia

SIL de alto grado (Liaw *et al.*, 1999). Aunque la SIL de alto grado tiene el potencial para progresar hacia el cáncer cervical, la mayoría de las SIL leves presentan una regresión espontánea, pero esta tasa de regresión es mucho menor en mujeres infectadas con HPV 16 o 18, en comparación con aquéllas infectadas con HPV 6 u 11 (tipos de bajo riesgo) (Ho *et al.*, 1995). Diversos estudios han concluido que la infección por HPV es principalmente transitoria y de corta duración (Ho *et al.*, 1998; Woodman *et al.*, 2001; Tomassino *et al.*, 2003), no obstante, es probable que este fenómeno se deba al establecimiento de una infección latente cuya producción viral se encuentre por debajo de los límites de detección, ya que los tipos de alto riesgo presentan una mayor probabilidad de establecer infecciones persistentes (Hildesheim *et al.*, 1994), de hecho, se ha observado que un solo hallazgo positivo de DNA de HPV en un Papanicolau confiere un riesgo incrementado de cáncer cervical invasivo positivo para el mismo tipo de virus (Wallin *et al.*, 1999). Sea que la presencia continua de DNA viral se deba a una reactivación de una posible infección latente, o bien a repetidas infecciones, la persistencia de HPV 16 o 18 es un predictor de SIL (Schlecht *et al.*, 2001), y se asocia con un mayor riesgo de SIL persistente (Ho *et al.*, 1995) y de desarrollo de cáncer cervical (Tallin *et al.*, 1999; Tomassino *et al.*, 2003), de hecho, existe una relación inversa entre la duración de la persistencia y la tasa de regresión espontánea (Ho *et al.*, 1995).

La persistencia viral puede conducir al desarrollo de una neoplasia de alto grado (Tomassino *et al.*, 2003), estas lesiones, así como los carcinomas, están formados por células proliferativas semejantes a las basales, en las que el DNA viral normalmente está integrado (Figura 5). Este evento ocurre invariablemente río abajo de los genes *E6/E7*, generalmente en la región de *E1* o *E2*, y se acompaña de una delección de las secuencias ubicadas río abajo, con lo que se pierde el control de la expresión de oncogenes mediada por *E2*, de forma tal que se observa un aumento en la expresión de *E6* y *E7* (Van Tine *et al.*, 2004). La integración se da en regiones del DNA hospedero que son transcripcionalmente activas, lo que también contribuye a la elevación en los niveles de

oncoproteínas virales resultando en una ventaja selectiva de crecimiento (Lowy y Howley, 2001). Los cánceres asociados a HPV mantienen y expresan los genes virales, incluso en etapas avanzadas de la enfermedad, y la represión de la expresión de los oncogenes virales puede prevenir el crecimiento y supervivencia de las células cervicales cancerosas: la represión de E6 y E7 en líneas celulares de cáncer cervicouterino, es capaz de restaurar la actividad de p53 y pRb, lo que es suficiente para inducir arresto celular o apoptosis (Psyrry y DiMaio, 2008).

La persistencia y evolución de las lesiones cervicales displásicas depende de varios factores, tales como la severidad de la lesión, el tipo de virus presente, la prevalencia y cantidad de transcritos de E6 y E7, y el número de copias virales. Se ha sugerido que el estado físico del genoma viral (episomal o integrado) es un factor clave que contribuye con la transformación maligna y la progresión de la enfermedad. En diversos estudios se ha demostrado que en tejido normal, lesiones NIC I y NIC II, se observan exclusivamente copias episomales, mientras que en lesiones CIN III/carcinoma *in situ*, es posible detectar secuencias integradas, o mezclas de secuencias integradas y episomales. Es interesante el hecho de que parece existir una correlación entre el tipo viral y el estado del genoma, ya que en varios reportes se ha sugerido que la integración del DNA de HPV 16 y la inactivación de E2 podría no ser un evento obligatorio en varios tumores. En contraste, la integración podría reflejar un evento crucial hacia la transformación maligna en lesiones con HPV 18, pero tal vez no sea un elemento obligatorio en una importante proporción de tumores positivos para DNA de HPV 16 (Hudelist *et al.*, 2004).

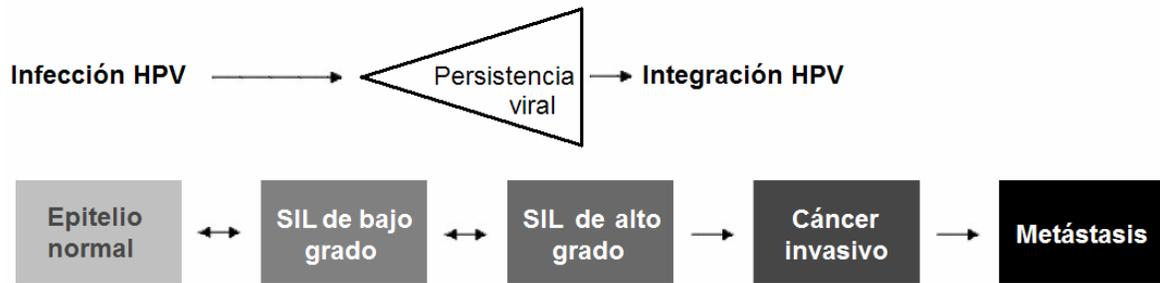


Figura 5. Progresión de las alteraciones inducidas por el HPV

La mayoría de las infecciones por HPV de alto riesgo tienen una regresión espontánea (representada por las flechas con doble cabeza). En algunos casos la persistencia de la infección lleva al desarrollo de SIL de bajo grado, caracterizada por diferenciación anormal del tercio inferior del epitelio. La lesión puede regresar o progresar a SIL de alto grado, la que puede regresar o evolucionar a carcinoma cervical invasivo. En la mayoría de los casos la transición al último coincide con la integración del genoma viral al del hospedero (adaptado de Tomassino, *et al.*, 2003).



EPIGENÉTICA

“Ella se mueve en formas misteriosas”

U2 “MYSTERIOUS WAYS”, 1991.

“Por tanto, dada la importancia del silencio,
rara vez se dé permiso para hablar a los discípulos perfectos”

BENITO DE NURSIA “REGLA DE SAN BENITO”, S. VI, D. C.

Históricamente la palabra “epigenética” se ha usado para describir eventos que no podrían ser explicados por principios genéticos. El término fue acuñado por Conrad Waddington en 1942, que definió a la epigenética como la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, “que hacen ser al fenotipo”. En un sentido amplio, la epigenética es el puente entre el genotipo y el fenotipo (Goldberg, 2007).

Hasta hace algunos años sólo los cambios en la secuencia genética, que explican variantes alélicas y mutaciones, habían recibido la mayor atención porque son conservados en el DNA genómico de los tumores y por tanto han sido más fáciles de detectar (Jones, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que el cáncer también puede ser iniciado e impulsado por patrones alterados de la expresión genética (cuantitativos) que son mediados por mecanismos que no cambian la secuencia primaria del DNA (Baylin, 2006) y que además pueden ser heredables (Jones, 1999). Estas alteraciones, por no ser genéticas, reciben el nombre de epigenéticas.

Actualmente se entiende por epigenética la función del genoma que está contenida afuera del genoma mismo y por medio de la cual se establecen alteraciones estables de la expresión genética (Dueñas-González *et al.*, 2005), es decir, una variación persistente en el potencial de la expresión génica que tiene lugar sin cambios en la secuencia del DNA (Das, 2004). Así, los factores epigenéticos proporcionan una forma heredable, reversible y dinámica para modular la expresión genética sin cambiar la secuencia genética (Santos-

Rebouças, 2007). La epigenética es un fenómeno que juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario, el cáncer y la respuesta inmune (Dueñas-González *et al.*, 2005).

Los cambios epigenéticos mejor estudiados son la metilación del DNA y la acetilación de histonas (Dueñas-González *et al.*, 2005). La última actúa afectando la estructura local de la cromatina, y en forma concertada con la primera, pueden regular la transcripción genética (Baylin, 2005).

Modificaciones Covalentes de las Histonas

El genoma eucarionte se encuentra organizado en la cromatina, ésta a su vez, se divide en eucromatina, donde el material genético se encuentra densamente empacado pero accesible a la maquinaria transcripcional; y en heterocromatina, con una alta densidad de empaquetamiento que vuelve transcripcionalmente inactivo al DNA involucrado (Lewin, 2004). Adicionalmente, regiones eucromáticas pueden ser silenciadas cuando son empaquetadas en un forma heterocromática, por lo que se habla, también, de una “hetercromatina facultativa”, que se define como aquellas regiones genómicas que muestran tal empaquetamiento sólo en un subgrupo de células o sólo para uno de los homólogos (por ejemplo la inactivación de uno de los cromosomas X). El estado silente de la heterocromatina facultativa persiste a través de las divisiones mitóticas (Richards y Elgin, 2002).

Los primeros estudios citológicos definieron a la heterocromatina como la porción del genoma que permanece condensada y muy pigmentada mientras la célula realiza la transición de metafase a interfase (Richards y Elgin, 2002). La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en aproximadamente 200 bp de DNA enrollado en la superficie de un octámero de histonas (un conjunto de pequeñas proteínas básicas). A su vez, una serie de nucleosomas se organizan en un arreglo helicoidal de unos 30 nm de diámetro llamado solenoide (6 nucleosomas por vuelta). Esta fibra es compactada aún

más, dando una tasa de empaquetamiento cercana a 1,000 en la eucromatina, y de 10,000 en la heterocromatina (Lewin, 2004).

Cada octámero de histonas se compone de dos copias de cada una de las siguientes proteínas: H2A, H2B, H3 y H4, que son llamadas histonas nucleares. Las últimas dos son algunas de las proteínas más conservadas entre eucariontes que se conocen (Lewin, 2004).

El nucleosoma tiene la forma de un cilindro aplanado. El DNA se pliega alrededor del octámero de histonas y las rodea dos veces. Esta asociación forma la partícula nuclear que contiene 146 bp de DNA, con 8 a 114 bp funcionando como DNA conector (Lewin, 2004). El octámero es un ensamblaje tripartito en donde un tetrámero $(H3-H4)_2$ está flanqueado por dímeros H2A-H2B; el nucleosoma tiene una forma de disco aplanado, que representa la proyección planar de una superhélice proteica levógira, siendo el diámetro de la partícula de 65 Å. Las histonas neutralizan el carácter negativo del DNA y funcionan como un andamio que determina el camino de éste (Arents *et al.*, 1991) (Figura 6).

Cada una de las histonas tiene un cuerpo globular que contribuye a la masa proteica central del nucleosoma; adicionalmente, poseen una cola N-terminal flexible (que corresponde a una cuarta parte de la masa proteica total) en la cual hay sitios de modificación que afectan la función de la cromatina. Aunque no se ha definido con precisión la ubicación de todas las colas, aquéllas de H3 y H2B pasan entre las vueltas de DNA y se extienden hacia afuera del nucleosoma (Lewin, 2004) (Figura 6).

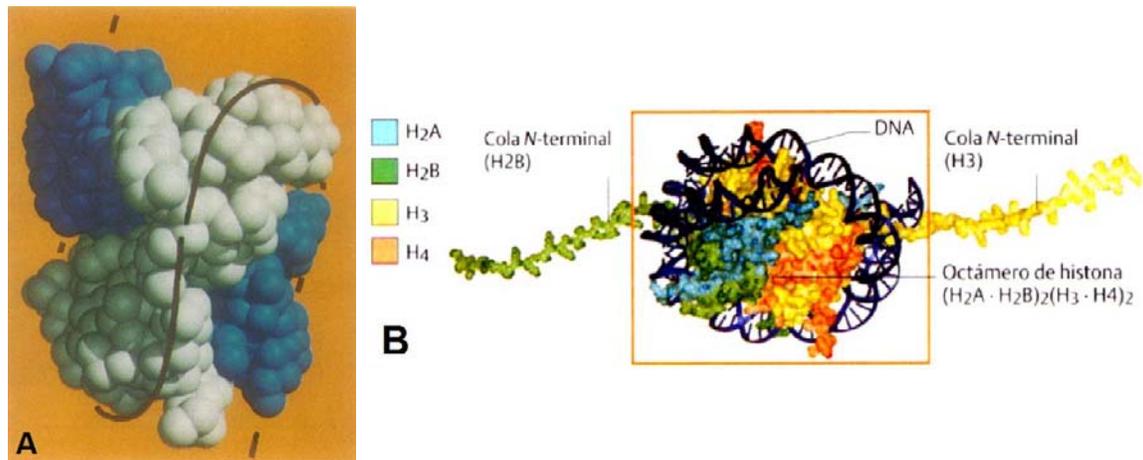


Figura 6. Estructura del nucleosoma

- A.** Los dímeros H2A-H2B están representados en azul y el tetrámero (H3-H4)₂ en gris claro. La línea negra indica el camino de la superhélice proteica levógira (tomado de Arents *et al.*, 1991)
- B.** Se distingue cada histona con un color diferente. Las colas amino terminales de H3 (amarillo) y H2B (verde) protruyen del nucleosoma, lo que les permite interactuar con el DNA y con otras proteínas remodeladoras de la cromatina a fin de regular la expresión genética

Se sabe que las colas de las histonas nucleares están sujetas a varias modificaciones postraduccionales, tales como la acetilación, fosforilación, mono-, di- o trimetilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación. Tales modificaciones ocurren en residuos específicos, y ciertos patrones de modificaciones se asocian con respuestas particulares en la expresión de ciertos genes (Strahl, 2000) a través de la remodelación de la cromatina (Lewin, 2004), afectando su estabilidad y la accesibilidad al DNA dentro de nucleosomas individuales. De hecho, se ha demostrado que las colas de las histonas H3 y H4 participan en interacciones con regiones específicas del DNA (preferencialmente con el que conecta un nucleosoma con el siguiente) y proteínas en la fibra condensada de cromatina (Angelov *et al.*, 2001).

Al menos cuatro clases de modificadores de las histonas participan en la regulación transcripcional: histona-acetiltransferasas (HATs); histona-desacetilasas (HDACs); histona-metiltransferasas (HMTs); e histona-cinasas. La acetilación de las histonas se correlaciona con la competencia transcripcional. En general, los activadores de la transcripción reclutan HATs y HMTs, mientras que los represores reclutan HDACs

(Orphanides y Reinberg, 2002). Recientemente se ha reportado la identificación de histona-desmetilasas que parecen tener un papel importante en la formación de heterocormatina y la represión de genes (Heinrichs, 2006). Los cambios que estas actividades enzimáticas producen en promotores individuales controlan si se iniciará la transcripción en ese gen, o si será silenciado. Las modificaciones a los residuos de las colas de histonas reducen su carga positiva (Lewin, 2004), lo que se traduce en una menor afinidad por el DNA y en una cromatina más abierta y transcripcionalmente activa. La acetilación de las colas de las histonas es reversible y ocurre principalmente en los residuos de lisina durante la replicación del DNA y cuando los genes son transcripcionalmente activos. La acetilación es reversible gracias a la acción de las HDACs, las que se encuentran presentes en complejos que tienen actividad represora (Lewin, 2004).

Por su parte, la metilación de las histonas y del DNA parecen asociarse con el silenciamiento y podrían estar conectadas, en virtud de que algunas HMTs contienen sitios potenciales de unión al sitio metilado CpG, o alternativamente, la metilación de las colas de histonas podría reclutar a la enzima encargada de metilar el sitio CpG (Lewin, 2004). Anteriormente no era claro si la metilación de las histonas puede ser reversible, ya que no se habían identificado actividades capaces de desmetilar histonas, y se pensaba en la posibilidad de que los efectos de la metilación pudieran ser neutralizados por otras modificaciones, o bien que las histonas metiladas fuesen degradadas, o que las colas se cortaran por proteasas (Orphanides y Reinberg, 2002). No obstante, investigaciones recientes han identificado varias histona-desmetilasas de la familia de proteínas que contienen un dominio JmjC. Esta actividad se restringe a la cola de la H3, específicamente a los residuos de lisina 9 y 36. Algunas de ellas median la desmetilación de residuos trimetilados, mientras que otras también pueden actuar sobre lisinas mono- y dimetiladas (Heinrichs, 2006) a través de una reacción de hidroxilación que requiere Fe^{2+} y α -cetoglutarato como cofactores (Cloos *et al.*, 2006). Aunque su papel fisiológico preciso

aún debe ser dilucidado por completo, es posible que estas enzimas sean importantes para modular finamente el estado de metilación de la cromatina (Heinrichs, 2006), ya que la evidencia parece indicar que distintos grados de metilación pueden correlacionarse con diferentes niveles de silenciamiento genético (Santos-Rebouças y Pimentel, 2007).

Así, se ha sugerido que el patrón de modificaciones actúa como un código de información (el código de histonas), que dicta las interacciones nucleosomales y la asociación de proteínas cromosomales diferentes de las histonas, que colectivamente determinan el empaquetamiento y regulan la expresión génica (Richards y Elgin, 2002).

Metilación/Desmetilación del DNA

La primera señal epigenética en ser reconocida fue la metilación del DNA, y dado su importante papel funcional, a la 5-metildesoxicitidina se le ha llamado el quinto nucleótido en el DNA (Doerfler, 2008), y es la única modificación al DNA que se conoce en mamíferos (Robertson, 2005) (siendo también prevalente en plantas (Richards y Elgin, 2002)). Ésta involucra la adición de un grupo metilo a la posición 5 del anillo de la base (Figura 7). Esta reacción es catalizada por una DNA metiltransferasa (DNMT) en el contexto de la secuencia palindrómica 5'-CG-3', también llamada dinucleótido CpG (Singal y Ginder, 1999). La reacción enzimática involucra la adición de un tior catalítico en la posición 6 de la citosina y la posterior transferencia de un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina, al carbono 5 de la citosina (Blackburn y Gait, 1996), para generar 5-metilcitosina (5-mC) y S-adenosilhomocisteína (Singal y Ginder, 1999) (Figura 7).

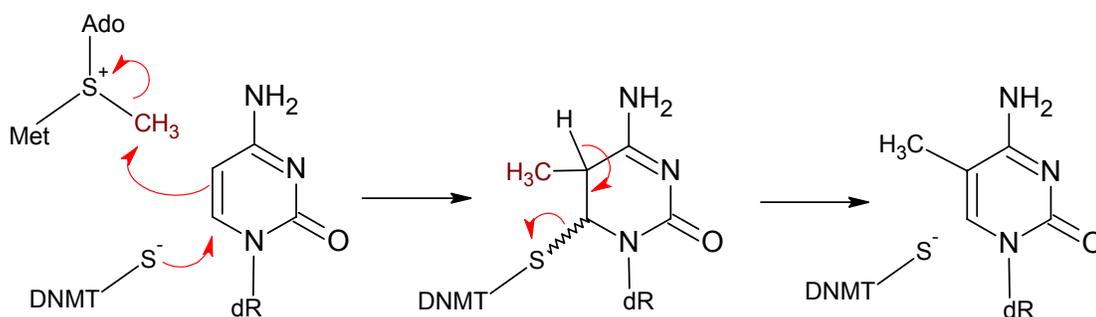


Figura 7. Mecanismo de metilación de la citosina en el carbono 5

El tiol catalítico de la enzima (DNMT) realiza un ataque nucleofílico en la posición 6, lo que conduce a la transferencia del grupo metilo desde la S-adenosilmetionina hacia el carbono 5. La desprotonación en 5 recupera el doble enlace de la pirimidina y rompe el enlace formado con el tiol catalítico (Blackburn, 1996).

La maquinaria de metilación del DNA de los mamíferos está formada por dos componentes: las DNMTs, que establecen y mantienen los patrones de metilación; y las proteínas de unión a metil-CpG (MBDs), que se encargan de “leer” las marcas de metilación (Robertson, 2005).

Dado que el DNA está compuesto por 4 bases, existen 16 posibles combinaciones de dinucleótidos, y por tanto, el dinucleótido CpG debería encontrarse con una frecuencia aproximada de 6%. No obstante, su presencia real es de apenas 0.3 a 0.6%, lo que podría estar relacionado con la hipermutabilidad de la citosina metilada (Das y Singal, 2004) a través de la desaminación espontánea de la 5-mC a timina, que causa una transición C a T. Adicionalmente, la presencia de 5-mC en un dinucleótido CpG parece ser un blanco preferido por ciertos carcinógenos exógenos como el BPDE (un metabolito del benzo[a]pireno, este último presente en el humo del cigarro) (Denissenko *et al.*, 1997). Aunque se conocen varias DNMTs: DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b con sus isoformas, y DNMT3L (Das y Singal, 2004), en el humano sólo tres de ellas parecen ser funcionales: DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (Rhee *et al.*, 2002). Las últimas dos están encargadas de realizar la metilación *de novo*, en particular, DNMT3b tiene una alta actividad metiladora en CpGs durante el desarrollo embrionario y DNMT1 apoya esta función, completando la metilación de los CpGs hemimetilados por

DNMT3b, es decir, posee una actividad de mantenimiento de la metilación (Ramsahoye *et al.*, 2000), inclusive en tejidos adultos. De hecho, DNMT1 normalmente está colocalizada con PCNA, indicando su función para conservar los patrones de metilación durante la replicación del DNA (Iida *et al.*, 2002), y hay evidencia que sugiere que se encuentra en la horquilla de replicación donde puede modificar el DNA naciente inmediatamente, con una alta preferencia por los sitios hemimetilados (Hermann *et al.*, 2004).

Recientemente se ha descrito que la DNMT2 tiene una débil actividad de DNA metiltransferasa, pero actúa como tRNA metiltransferasa (Santos-Rebouças, 2007). Por su parte, DNMT3a lleva a cabo metilación *de novo*, probablemente sólo en células embrionarias, y tanto en sitios CpG como no-CpG, siendo CpA el más común. De esta forma, cuando la expresión de las DNMT3 es regulada a la baja en etapas posteriores del desarrollo, no hay metilación *de novo* y aquella presente en sitios no-CpG se pierde de forma concomitante (Ramsahoye *et al.*, 2000). En conjunto, DNMT3a y DNMT3b parecen ser responsables del establecimiento de un patrón de metilación inicial en los genomas en desarrollo, mientras que DNMT1 es expresada constitutivamente en células proliferativas y funciona como una enzima de mantenimiento que garantiza que tal patrón sea copiado fielmente a las células hijas (Lin *et al.*, 2005).

Por ejemplo, en las células germinales ocurre una metilación diferencial de regiones de control improntadas, la cual es mantenida durante todo el desarrollo. Esta impronta genómica es una modificación epigenética en uno de los cromosomas parentales, en el gameto o el cigoto, que conduce a una expresión diferencial de ambos alelos de un gen. La pérdida de estas marcas epigenéticas resulta en la disrupción de la impronta, ya sea por pérdida, o por ganancia de metilación del DNA, o por la pérdida de la expresión alelo-específica (Robertson, 2005). Durante el desarrollo de las células germinales y en la embriogénesis temprana, el genoma atraviesa dos etapas de desmetilación y metilación *de novo* que modifican sustancialmente las marcas epigenéticas, y aunque no se había documentado su transmisión a la descendencia a través de las células germinales, en un

estudio reciente se reportó la herencia de una epimutación en línea germinal, con distinta distribución entre tejidos, que se desvía del patrón Mendeliano de herencia, y que podría actuar como el primer evento en la carcinogénesis (Chan *et al.*, 2006).

La maquinaria de metilación del DNA incluye desmetilasas, centros de DNA que disparan la metilación, y otros que la evitan. Dentro de las enzimas que desmetilan al DNA se encuentran la 5-metilcitosina glucosilasa y la proteína 2 de unión al dominio metil-CpG (MBD2b). La primera remueve la 5-mC del DNA mediante hidrólisis del enlace glicosídico, dejando a la desoxirribosa intacta en el esqueleto, mientras que se piensa que la segunda produce la desmetilación hidrolizando la 5-mC para producir citosina y metanol (Das, 2004).

Aunque los dinucleótidos CpG se hallan en el genoma en una proporción menor de la predicha, éstos se encuentran con mayor frecuencia en pequeños segmentos de DNA llamadas islas CpG. Estas normalmente se localizan en o cerca de regiones promotoras de ciertos genes (Baylin, 2005) y por lo tanto, son buenos blancos para la actividad de las DNMTs.

Las islas CpG son regiones genómicas que se caracterizan por una frecuencia excepcionalmente alta de dinucleótidos CpG. De acuerdo con el criterio de Gardiner-Gardner, una región debe cumplir con los siguientes criterios para ser considerada una isla CpG: 1) contenido de CG mayor a 50%; 2) proporción de dinucleótidos CpG observados:esperados superior a 0.6; 3) longitud mínima de 200 pares de bases (algunas clasificaciones consideran 500 bps). Actualmente se sabe que las islas CpG se asocian con más de tres cuartas partes de los sitios conocidos de inicio de la transcripción, por ejemplo, en fibroblastos primarios se han encontrado islas CpG en 88% de los promotores activos (pues en general están desmetiladas). De hecho, estas regiones suelen ser blanco de factores de transcripción ubicuos, así como presentar estructuras de cromatina especialmente accesibles, por lo que también se han empleado para predecir promotores (Bock *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se ha postulado clasificar a las islas CpG de acuerdo con cuán “fuertes” son, es decir, tomando en cuenta la composición de su secuencia y su estado epigenético, con lo que se puede hablar, también de islas CpG débiles, intermedias y fuertes (Bock *et al.*, 2007).

Ahora bien, los grupos metilo de la 5-mC se proyectan hacia el surco mayor del DNA (Baylin, 2005), y en virtud de que varios factores de transcripción reconocen secuencias que contienen residuos CpG, una metilación incrementada en la región promotora de un gen conduce a una menor expresión del mismo (Das, 2004) debido a la interferencia estérica que evita que el factor de transcripción interactúe con su elemento de respuesta. Ello resulta en silenciamiento epigenético de tales genes. Adicionalmente, la metilación del DNA recluta a las desacetilasas de histonas y a otras proteínas de unión a la cromatina (Baylin, 2005) que al unirse a la 5-mCpG a través de un motivo llamado dominio de unión a metil-CpG (MBD), o mediante dedos de zinc, actúan como represores transcripcionales. Por ejemplo, las proteínas MeCP2, MBD2 y MBD3 contienen un dominio de unión a metil-CpG y forman complejos (MeCP-2, MeCP-1 y Mi-2, respectivamente) que contienen desacetilasas de histonas (HDACs) (Das, 2004). Actualmente se conocen al menos 5 miembros de la familia MBD: MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, y MBD4. El primer dominio de unión fue identificado en MeCP2 (70 aminoácidos) y su secuencia se empleó para identificar a las otras proteínas MBD en bases de datos. Se han descrito otras proteínas capaces de unirse selectivamente al DNA metilado, como la proteína Kaiso, miembro de una familia de proteínas con dedos de zinc, que se asocian con complejos correpresores que contienen a la HDAC3 (Lopez-Serra y Esteller, 2008).

Por otro lado, se ha reportado la interacción física entre la DNMT1 y las HDACs. Esta interacción no requiere del dominio catalítico de la primera, sugiriendo que puede funcionar como un correpresor transcripcional de forma independiente de su actividad de metiltransferasa. Esta interacción puede ayudar a reforzar la herencia de patrones de cromatina silente, facilitando la acetilación de histonas en las horquillas de replicación,

donde la DNMT1 actúa para mantener la marca epigenética de la 5-mC en las secuencias hemimetiladas (Richards y Elgin, 2002).

En contraste, las islas CpG no metiladas se encuentran en una configuración más abierta que permite la entrada de los factores de transcripción. Sin embargo, cuando estas están metiladas, los nucleosomas se vuelven más compactos inhibiendo el acceso de los factores activadores de la transcripción (TAFs) y de factores de transcripción. Todo esto ocurre en concierto con la acción de las HDACs a través de la remodelación de la estructura de la cromatina (Baylin, 2005). De forma alternativa al reclutamiento de la maquinaria enzimática, la unión de las proteínas MBD a los residuos metilados podría remodelar la cromatina influyendo sobre la posición local del nucleosoma en relación con los 5-mCpG o en el ensamblaje de una estructura de cromatina de orden mayor (Wade, 2005).

Varios estudios han demostrado que los promotores de genes silenciados (en comparación con sus contrapartes transcripcionalmente activas) contienen regiones localizadas de marcas silenciadoras que incluyen metilación de islas CpG, desacetilación y metilación de aminoácidos clave en la histona H3, como la desacetilación de las lisinas 9 y 14 y la monometilación de la lisina 9. Por su parte, una modificación activadora clave, la monometilación de la lisina 4, se encuentra disminuida. En todos estos eventos represores, la metilación del DNA parece jugar un papel predominante, ya que la inducción farmacológica de la desmetilación del DNA puede reestablecer la expresión genética y hacer aparecer marcas de activación transcripcional (acetilación en los residuos K9 y K14, y metilación de K4 en la cola de H3) (Baylin, 2006). La metilación del DNA confiere silenciamiento a largo plazo, mientras que las desacetilasas inhiben la transcripción a corto plazo (Van Tine *et al.*, 2004).

Resulta interesante el hecho de que la marca epigenética H3-mK9 (metilación de la lisina 9 en la histona H3) parece dirigir la metilación del DNA, al menos, en *Neurospora*, pues la sustitución de H3 silvestre por una con una sustitución en la posición 9 reduce la

metilación de la citosina y el silenciamiento mediado por la misma, adicionalmente, en humanos se ha demostrado alteración de la metilación del DNA en respuesta a mutaciones en proteínas tipo SWI2/SNF2, apoyando la existencia de un llamado modelo “cromatina primero/citosina segundo” (Richards y Elgin, 2002).

Metilación Aberrante del DNA en Cáncer

Las funciones de la metilación del DNA son diversas en células normales e incluyen el silenciamiento de elementos transposables, inactivación de secuencias virales, mantenimiento de la integridad cromosómica, inactivación del cromosoma X, impronta y regulación transcripcional de diversos genes (Brena *et al.*, 2005).

Aproximadamente 80% de todos los sitios CpG del genoma se encuentran metilados y se localizan principalmente en secuencias repetidas y en los centrómeros. Por otro lado, se ha observado que entre 50 y 60% de los genes humanos están asociados con una isla CpG, y se sabe que la metilación de éstas se relaciona con alteraciones de la expresión de sus genes asociados (Brena *et al.*, 2005). Existen estimaciones que sugieren que existen al menos 29,000 islas CpG en el genoma humano, muchas de las cuales se encuentran en las regiones 5' de diversos genes (Feltus *et al.*, 2003). Las regiones promotoras que contienen tales islas comúnmente se encuentran desmetiladas en los tejidos normales, independientemente del estado transcripcional del gen (Santini *et al.*, 2001), no obstante pueden ser metiladas *de novo* en células cancerosas (Feltus *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que los promotores de algunos genes supresores de tumores se encuentran metilados en malignidades donde normalmente tales genes están mutados. De manera general, esta metilación se observa sólo en el alelo silvestre cuando el otro alelo está mutado, o en ambos cuando los dos son silvestres. Esto indica que el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores confiere ventajas de

crecimiento o supervivencia a las células en las que éste ocurre (Feltus *et al.*, 2003) y por tanto se ha planteado como uno de los dos eventos propuestos en la teoría de los dos *hits* de Knudson para la transformación oncogénica (Das, 2004). Inclusive, existen estudios que indican que el silenciamiento epigenético ocurre más frecuentemente durante las etapas tempranas del proceso neoplásico, pudiendo predisponer a las células a adquirir nuevas alteraciones genéticas (Baylin, 2006).

Al parecer, algunas islas CpG son más propensas a la metilación *de novo* que otras. De hecho, se sabe que las DNMTs interactúan con factores de transcripción de forma tal que este proceso puede estar “dirigido” a regiones particulares del genoma a través de esta interacción con proteínas de unión al DNA secuencia-específicas (Feltus *et al.*, 2003), hipótesis que ha sido apoyada por algunos resultados experimentales (Jair *et al.*, 2006). Dentro de los genes frecuentemente hipermetilados en cáncer se cuentan moléculas de adhesión, inhibidores de la angiogénesis, maquinaria de reparación del DNA, reguladores del ciclo celular, inhibidores de la metástasis, entre otros (Brena *et al.*, 2005). Sin embargo, hay reportes que sugieren que la hipermetilación en cáncer no siempre se asocia con represión de la transcripción, ya que en algunos casos las islas CpG no se encuentran en un promotor, la metilación afecta a genes que normalmente no se expresan en los tejidos enfermos, o bien, se trata de metilación muy dispersa que no afecta de forma importante la expresión genética. La metilación aberrante es, entonces, un mecanismo para generar diversidad molecular en la displasia (Santini *et al.*, 2001).

En adición a la metilación de islas CpG, en las células cancerosas es frecuente observar la hipometilación de regiones normalmente metiladas. Esta hipometilación se ha asociado con inestabilidad cromosómica que resulta en mayores tasas de mutación y expresión genética anormal (Brena *et al.*, 2005).

La hipometilación global también se ha observado frecuentemente en el cáncer cervicouterino y ésta muestra un incremento progresivo que es proporcional al grado de

maligñidad y se piensa que contribuye con la oncogéñesis mediante la activación de oncogenes como *cMYC* y *H-RAS*, o bien, de retrotransposones (Das, 2004).

Por otro lado, se han encontrado patrones de hipermetilación de los promotores de ciertos supresores de tumores en diferentes tipos de cáncer cervical (Kang *et al.*, 2005) y existen resultados experimentales que sugieren que la expresión de DNMT3b (necesaria para la metilación *de novo*) está fuertemente correlacionada con la infección por HPV 16 o 18, más aún, la sobreexpresión de DNMT1 y DNMT3b es común en tumores humanos (Lin *et al.*, 2005) y la cooperación entre ambas parece ser necesaria para mantener la metilación, tanto la normal, como la asociada con silenciamiento de supresores de tumores (Rhee *et al.*, 2002), con DNMT3b jugando un importante papel en la transformación celular (Lin *et al.*, 2005). Así, el mantenimiento de la metilación de sitios CpG en células cancerígenas humanas no depende sólo de DNMT1 o de DNMT3b, sino de la actividad catalítica de ambas (Jair *et al.*, 2006).

Se han encontrado patrones de metilación aberrante en genes celulares a lo largo de los múltiples pasos de la carcinogéñesis cervical, con una tendencia hacia el aumento de la metilación con mayores cambios patológicos (Widschwendter *et al.*, 2004), de hecho, se ha sugerido que la detección cuantitativa de metilación de promotores en raspados vaginales puede emplearse como herramienta diagnóstica para el cáncer cervical (Reeskin-Peters *et al.*, 2004). En un estudio reciente no se encontró metilación en los promotores de 29 genes supresores de tumores estudiados en líneas celulares pre-malignas, mientras que la progresión a la independencia de la adhesión se asoció con la acumulación de eventos de metilación en los promotores de cinco genes que también se encontraron metilados en carcinomas, donde 12 de 29 supresores estudiados mostraron metilación (Henken *et al.*, 2007).

Toda esta evidencia señala hacia un importante papel de la regulación epigenética en la progresión del cáncer cervicouterino.



CONTROL EPIGENÉTICO EN EL HPV 16

“Extremadamente sutil, el experto no deja huellas;
completamente misterioso, se vuelve inaudible.
De esta manera tiene al oponente a su merced.”

SUN TZU “EL ARTE DE LA GUERRA”, 500 A. C.

“No saben que la mano señalada
del jugador gobierna su destino,
no saben que un rigor adamantino
sujeta su albedrío y su jornada.”

JORGE LUIS BORGES “AJEDREZ” (FRAGMENTO), 1978.

Ya desde 1984 se publicaron reportes sobre metilación de sitios CpG en modelos de HPV, sugiriendo que este proceso podría tener un papel en el control de la expresión de los genes virales en sus células hospederas (Burnett, 1984). De hecho, aunque se esperaría que los HPVs tuvieran alrededor de 400 sitios CpG, en realidad hay muchos menos, apoyando la idea que tienen una función dentro de la biología de estos virus (Badal *et al.*, 2003).

Después de la infección, el virus mantiene su genoma como un episoma de bajo número de copias (10 a 200) en las células basales del epitelio, en donde expresa las proteínas tempranas necesarias para la replicación del DNA viral y su mantenimiento como episoma (Doorbar, 2005), lo que es necesario para que éste pueda ser empaquetado en las cápsides virales en las capas superiores del epitelio, para dar lugar a partículas infecciosas.

Tras cierto periodo de persistencia, y por razones no del todo claras, el DNA del HPV puede integrarse al del hospedero. Esta integración se considera como un evento temprano en la carcinogénesis cervical (Rosl *et al.*, 1993) y se asocia a la pérdida de la región E1/E2 (cerca de la mitad del genoma viral). La pérdida de esta región trae como consecuencia un aumento en la expresión las oncoproteínas E6 y E7. El DNA viral

integrado normalmente se encuentra metilado, ya que el DNA que se integra es un blanco preferencial para la metilación y la inactivación transcripcional (Turan *et al.*, 2006). No obstante, evidencia experimental sugiere que el genoma viral en su estado de episoma podría también ser metilado frecuentemente (Badal *et al.*, 2003).

La proteína E2 controla varios procesos del ciclo viral, tales como la replicación del DNA del HPV, la herencia estable del plásmido durante la división celular, y la transcripción de los genes virales. Estas actividades dependen de la capacidad de E2 de unirse como homodímero a sus secuencias blanco, parcialmente palindrómicas (5'-ACCGN₄CGGT-3') en el DNA del virus, llamadas sitios de unión de E2 (E2BSs). Dado que estas secuencias contienen dinucleótidos CpG, son blancos potenciales de metilación, y de hecho, se ha demostrado que la capacidad de E2 para unirse a las E2BSs es inhibida por la metilación de las citosinas antes mencionadas, y existen reportes que señalan que ésta varía significativamente dependiendo del estado de diferenciación de las células hospederas (Kim *et al.*, 2003).

En los genomas de los virus de alto riesgo se encuentran cuatro E2BSs altamente conservados en la LCR (Kim *et al.*, 2003), es decir, estos dinucleótidos CpG se traslapan con el *enhancer* y el promotor del virus (Badal *et al.*, 2003). El desplazamiento de E2 no parece deberse a un impedimento de tipo estérico causado por el grupo -CH₃, más bien, a la competencia con proteínas de unión a DNA metilado (Rosl *et al.*, 1993). E2 normalmente funciona como represor del promotor P97, por lo que la metilación de éste debería hacerlo transcripcionalmente activo (Badal *et al.*, 2003); no obstante, existen estudios en los que se transfectó DNA de HPV metilado *in vitro*, que demuestran que la consecuencia de la metilación es la represión transcripcional (Kalantari *et al.*, 2004).

Una célula que ha sido immortalizada gracias a la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, contiene múltiples copias del genoma viral integradas. Cuando estas células han sido pasadas de una caja de cultivo a otra durante pocas ocasiones, suelen no ser tumorigénicas en ratones desnudos; no obstante, al aumentar el número de pasajes,

estas células comienzan a presentar una morfología más displásica (que simula las características histopatológicas de las displasias de grado bajo, moderado y alto) y en algún momento surgen clones tumorigénicos tras cultivarlas durante largo tiempo. Se ha demostrado que independientemente del número de copias de DNA de HPV integradas o número de sitios de integración, la selección natural favorece a las células que contienen uno, o máximo dos, centros virales transcripcionalmente activos, los cuales suelen estar en la unión virus/hospedero y ser perinucleolares. El resto de las copias son silenciadas mediante cambios epigenéticos mediados por la metilación de citosinas. Estos cambios parecen ocurrir también *in vivo*, ya que en cánceres faríngeos y endocervicales positivos para HPV 16, se detectó un solo centro de RNA viral independientemente del número de focos de DNA. Este centro de RNA es clonal, implicando una expresión regulada (Van Tine *et al.*, 2004). Este conjunto de evidencia sugiere que la progresión hacia la malignidad requiere un aumento en la metilación del genoma del HPV.

Las investigaciones sobre los patrones de metilación en diferentes etapas del cáncer estimulado por los HPVs no han arrojado resultados consistentes, y en el mejor de los casos han permitido ver algunas tendencias. Debido a la importancia de los elementos *cis* localizados en la *LCR*, algunos de los análisis hasta ahora se han centrado principalmente en esta región. No obstante, Badal y colaboradores realizaron un análisis del estado de metilación de los CpGs de todo el genoma viral de HPV 16 mediante modificación con bisulfito (ver material y métodos) y secuenciación, en células SiHa y CaSki (que contienen una o dos copias, y alrededor de quinientas copias, respectivamente, del genoma viral). Se encontró metilación particularmente alta en la región de los genes tardíos, así como desmetilación en la *LCR* y los oncogenes virales en SiHa. Estos mismos autores reportan que la metilación de los genomas virales disminuye conforme avanza la severidad de las lesiones. Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es que existe la posibilidad de estudiar poblaciones celulares heterogéneas (Badal *et al.*, 2003).

De igual forma, Kim y colaboradores encuentran una mayor metilación en los E2BSs y la *LCR* de HPV 16 en células epiteliales menos diferenciadas, con un cambio hacia un estado hipometilado en células más diferenciadas que mantienen la amplificación del DNA viral y se sugiere que esto contribuye con la transcripción desde el promotor tardío y a la amplificación vegetativa del genoma. Con esto concluyen que existe un menor grado de metilación en sitios CpG conforme las lesiones progresan hacia cáncer cervical franco (Kim *et al.*, 2003).

En contraste con los estudios anteriores, Kalantari y colaboradores estudiaron el extremo 3' de *L1* y la *LCR*, obtuvieron clones de diferentes muestras a fin de reducir la heterogeneidad de las poblaciones celulares estudiadas, y reportaron que los 500 genomas de las células CaSki no se encuentran metiladas de forma homogénea, encontrando diferencias entre copias intracromosómicas repetidas en *tandem*, y aquéllas insertadas en diferentes posiciones cromosómicas, lo que sugiere que cada posición está sujeta a una probabilidad diferente de ser metilada, encontrando una probabilidad de 29 a 41% en los sitios 7091, 7136 y 7145 (en el extremo 3' de *L1*), en comparación con una probabilidad cercana a 10% en todos los demás CpGs. Al extender el análisis a muestras de pacientes, se encontró una menor metilación en los casos de displasia, con un aumento de la metilación en la mayoría de los sitios estudiados, en los carcinomas (Kalantari *et al.*, 2004).

En línea con estos resultados, el grupo de Wiley investigó los patrones de metilación en el promotor y el *enhancer* de HPV 16 (localizados en la *LCR*) en muestras de epitelio anal de hombres infectados con HIV. Se encontró una frecuencia promedio de metilación de 12.3%, notando patrones heterogéneos entre clones de diferentes y de las mismas muestras. En las neoplasias de bajo grado, en general se encontró un alto grado de metilación en los CpGs localizados en el *enhancer* y un bajo nivel en el promotor, aumentando en la última región en lesiones de alto grado, especialmente en presencia de una fuerte carga viral (Wiley *et al.*, 2005).

Al parecer, en infecciones asintomáticas la *LCR* se encuentra metilada, ésta disminuye de forma importante en lesiones precursoras, con un proceso de remetilación en lesiones de alto grado y en carcinomas. Así, es posible que el HPV 16 sea reprimido transcripcionalmente tras la infección, pero necesita ser desmetilado para iniciar el proceso de transformación. En los carcinomas, por su parte, el DNA viral se encuentra integrado y transcripcionalmente inactivado por la metilación que ocurre tras la integración (Turan *et al.*, 2006). Es decir, el ciclo normal del HPV 16 se encuentra restringido a las infecciones asintomáticas y a las lesiones intraepiteliales, mientras que la progresión carcinogénica es un accidente, dado que en esta etapa ya no se producen virus (Badal *et al.*, 2003). En apoyo a esto, se sabe que los virus tumorigénicos producen tumores en sitios donde su ciclo vital no puede ser completado, y se ha demostrado que en mujeres que no resuelven su infección por un HPV de alto riesgo, sus lesiones pueden progresar hacia la neoplasia intraepitelial grado 1 (CIN1), a CIN2, CIN3 y a cáncer. La CIN1 simula una infección productiva, mientras que las CIN 2 y 3 tienen una fase proliferativa más extensa donde el ciclo viral es sostenido de manera pobre. La integración del genoma viral suele acompañarse de una desregulación en la expresión de E6 y E7, lo que conduce a una mayor proliferación celular, con un incremento en la expresión de E7, pero con una marcada reducción en la replicación del DNA viral y en la producción de proteínas de la cápside (Doorbar, 2005) (Figura 8). De hecho, en estudios de detección inmunohistoquímica de la proteína L1 no se encontró expresión de ésta en carcinomas *in situ* o invasivos (Toro, 2005) o en lesiones de alto grado (Melsheimer *et al.*, 2003), señalando que las proteínas estructurales del HPV se detectan en epitelios displásicos con cierto grado de diferenciación escamosa (Toro, 2005).

Es probable que los HPVs de alto riesgo sean incapaces de completar su ciclo viral en la zona de transformación de cérvix haciendo a esta región especialmente susceptible al desarrollo de cáncer (Doorbar, 2005).

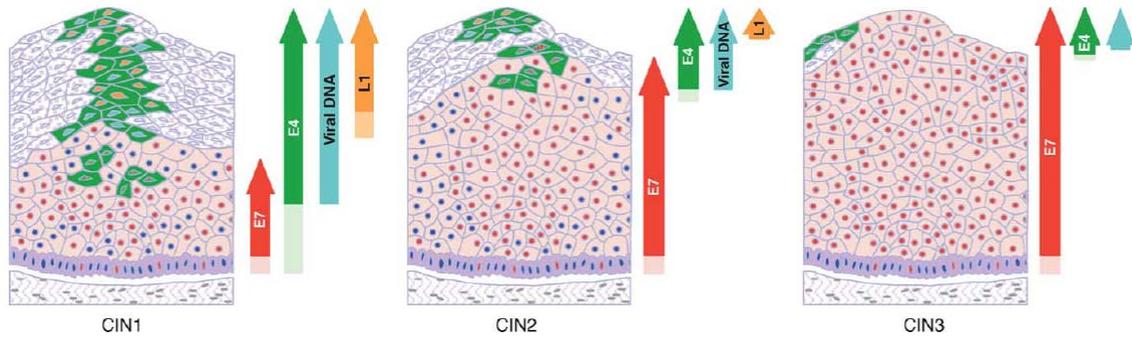


Figura 8. Cambios en la expresión de genes virales en el ciclo de HPV 16 durante el desarrollo de cáncer cervical

Durante la progresión de CIN 1 a 3 se pierde la regulación del ciclo viral normal. CIN1 se asemeja a una infección productiva, con expresión de proteínas de la cápside viral en la superficie del epitelio. En CIN2 y 3 el orden de los eventos no cambia, pero se incrementa la extensión de la expresión de E7 (tomado de Doorbar, 2005)

La metilación del genoma de HPV 16 en las infecciones asintomáticas podría indicar que la metilación es parte normal de la biología del virus (Badal *et al.*, 2003), induciéndole a entrar en una fase de latencia, en la que hay replicación funcional pero transcripción reprimida (Wiley *et al.*, 2005). Esta metilación puede constituir un mecanismo de defensa de la célula, precisamente para evitar la transcripción viral (Kim *et al.*, 2003), inclusive, la hipótesis de la defensa del genoma se ve apoyada por el hecho de que los retrovirus integrados, los transgenes y los genomas virales transfectados están frecuentemente metilados (Kalantari *et al.*, 2004).

No obstante lo anterior, se sabe que la proteína E7 puede unirse a varias proteínas celulares a fin de superar el arresto de la proliferación y así hacer entrar a las células a la fase S del ciclo celular, siendo su función más conocida secuestrar a pRb de los complejos E2F, y recientemente se ha demostrado que la proteína E7 del HPV 16 puede unirse directamente a la DNMT1 mediante un dominio que contribuye a sus funciones transformadoras, además de incrementar significativamente la actividad metiladora de la última, probablemente a través de su estabilización. Se ha sugerido que esta mayor actividad podría tener consecuencias similares a la metilación aberrante del genoma

seguida por transformación celular como resultado del silenciamiento de genes supresores de tumores (Burgers *et al.*, 2006).

Por otro lado, Turan y colaboradores analizaron los patrones de metilación en HPV 18, encontrando que en infecciones asintomáticas y en lesiones precancerosas el DNA de este tipo viral se encuentra principalmente desmetilado, aunque en todos los carcinomas estudiados se observó metilación de la región 3' de *L1*, mientras que la *LCR* y la zona 5' de *E6* permanecieron desmetiladas. A pesar de que parece haber diferencias significativas entre la regulación epigenética de los HPV 16 y 18, en los carcinomas ambos muestran una metilación preferencial de *L1* (Turan *et al.*, 2006).

Tanto el gen que la codifica, como la proteína L1, están altamente conservados entre los papilomavirus (Doorbar, 2005; Toro, 2005), sugiriendo que ésta juega un importante papel dentro de la biología del grupo viral.

Aunque se ha hipotetizado que la metilación de citosinas en la región codificante podría afectar la competencia transcripcional del DNA templado (Kim *et al.*, 2003) o de ser el núcleo desde el que la metilación se extienda a los promotores (Kalantari *et al.*, 2004) el incremento en la metilación de *L1* podría sugerir un papel adicional en el interruptor temprano-tardío (Badal *et al.*, 2003; Kalantari *et al.*, 2004; Turan *et al.*, 2006), que es un evento multifacético que involucra el uso diferencial de promotores, *splicing*, elongación y estabilidad del mRNA (Badal *et al.*, 2003).



PCR ESPECÍFICA PARA METILACIÓN (MS-PCR)

Técnicas convencionales de análisis de secuencias CpG metiladas se han basado principalmente en acercamientos de hibridación tipo *Southern*, o al uso de enzimas de restricción sensibles a metilación, para cortar secuencias que contienen 5m-CpG. Otros métodos más sensibles incorporaron el uso de enzimas sensibles a la metilación con PCR. El problema de estos acercamientos es que sólo pueden monitorear la metilación en sitios de restricción sensibles a ésta y es relativamente sencillo que arrojen falsos positivos debido a digestiones incompletas (Herman *et al.*, 1996).

La modificación química de la citosina, para convertirla en uracilo, mediante tratamiento con bisulfito, ha proporcionado otro método para el estudio de la metilación del DNA que evita el uso de enzimas de restricción. En esta reacción, todas las citosinas son convertidas, mediante desaminación oxidativa, a uracilo. Sin embargo, aquellas que están metiladas son resistentes a esta modificación y permanecen como citosinas (Herman *et al.*, 1996) (Figura 9). Cabe mencionar que esta reacción no siempre tiene una eficiencia de 100%.

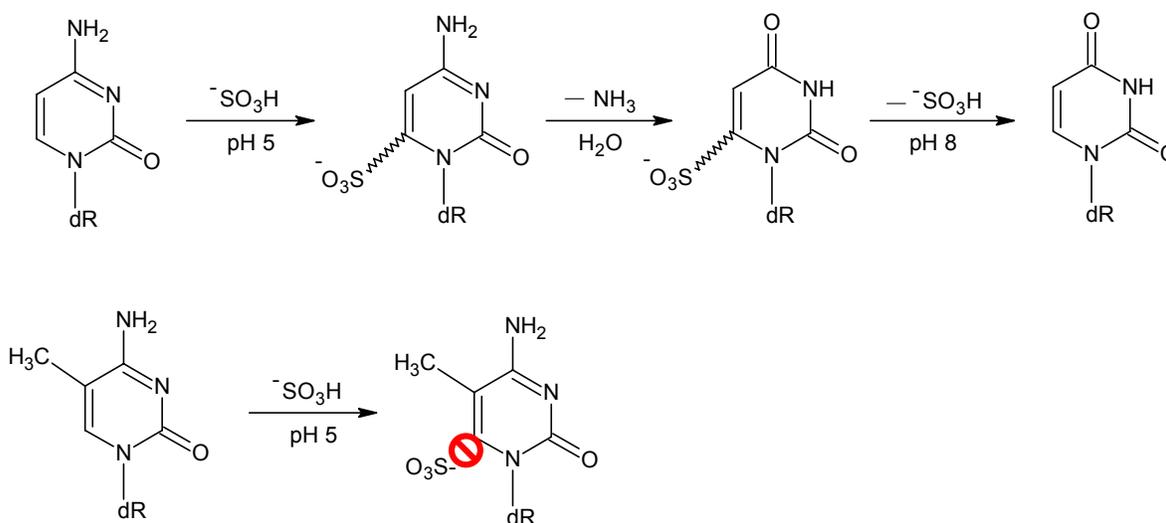


Figura 9. Mecanismo de desaminación química de la desoxicitidina catalizada por bisulfito

A un pH de 5 o 6 el bisulfito (equivalente a dióxido de azufre acuoso) produce la desaminación de las citosinas no metiladas para producir uracilo. El bisulfito se elimina a pH 8 o 9 (Blackburn, 1996). La presencia de un grupo metilo en el carbono 5 de la citosina previene la reacción de desaminación del carbono 4

Este DNA modificado puede ser amplificado y secuenciado, aunque es necesario clonar los productos amplificados a fin de analizar genomas individuales, lo que hace que la técnica sea sensible (Herman *et al.*, 1996), especialmente si las poblaciones celulares estudiadas contienen mezclas de genomas virales con CpGs o 5-mCpG en las mismas posiciones, ya que es imposible analizar por este método mezclas de moléculas metiladas y no metiladas. Esto es particularmente limitante en muestras en donde uno de ambos tipos supera ampliamente en número al otro (Kalantari *et al.*, 2004).

La PCR específica para metilación (MS-PCR) es una técnica específica y sensible para varios sitios CpG, en la cual se diseñan oligonucleótidos específicos para distinguir el DNA metilado del no metilado tras un tratamiento con bisulfito, con base en las diferencias en secuencia que resultan de esta modificación (Herman *et al.*, 1996): las citosinas no metiladas son convertidas a uracilo. Durante el primer ciclo de PCR se forman pares U·A, y en el siguiente ciclo se forman pares A·T, con lo que un nucleótido de timina es incorporado en el producto por cada uracilo (citocina desmetilada) presente en el templado original, mientras que la 5-mC permanece como tal y continúa dando lugar a pares C·G durante la PCR, por lo que es incorporado un nucleótido de citosina por cada 5-mC presente en el templado tratado con bisulfito (Brena, 2005).

Dado que ambas cadenas de DNA dejan de ser complementarias tras el tratamiento con bisulfito, es posible diseñar oligonucleótidos para cada una de ellas. Si las secuencias de éstos contienen varias citosinas y sitios CpG cerca del extremo 3', la falta de complementariedad hace que cada juego de oligonucleótidos cebe la amplificación sólo del templado para el que fueron diseñados (Herman *et al.*, 1996).



AMPLIFICACIÓN/SUPRESIÓN DE LA PCR POR *HEADLOOPS*

Esta es una técnica para la supresión selectiva de la amplificación de una o más secuencias cercanamente relacionadas, empleando oligonucleótidos que pueden cebar y extender a la secuencia blanco y suprimir la amplificación de otra secuencia que difiera de aquélla por unos pocos nucleótidos. Estos oligonucleótidos contienen una región que es complementaria a la secuencia a amplificar (actuando como cebadores normales) más una extensión en 5' (cabeza) que es complementaria (y reversa) a una secuencia que se encuentra dentro del amplicon. Tras la tercera ronda de síntesis, el extremo 3' no hibridado, denominado "cabeza", es capaz de girar e hibridizar con la secuencia interna perfectamente complementaria para formar una estructura de *loop* (o asa) que proporciona un grupo -OH en la posición 3', sustrato para la DNA polimerasa, la cual completa la síntesis del *hairpin* (tallo/asa), que, en virtud de su rápida velocidad de hibridación intramolecular es refractario a rondas subsecuentes de amplificación. Así, la "cabeza" (*head*) del oligonucleótido puede ser diseñada para formar un "asa" (*loop*) y suprimir selectivamente la amplificación, ya sea de secuencias derivadas de DNA metilado, o bien desmetilado, con base en las diferencias obtenidas tras la conversión de citosinas desmetiladas en timinas, y la permanencia de citocinas en el caso de 5-meC (Rand *et al.*, 2005) (Figura 10).

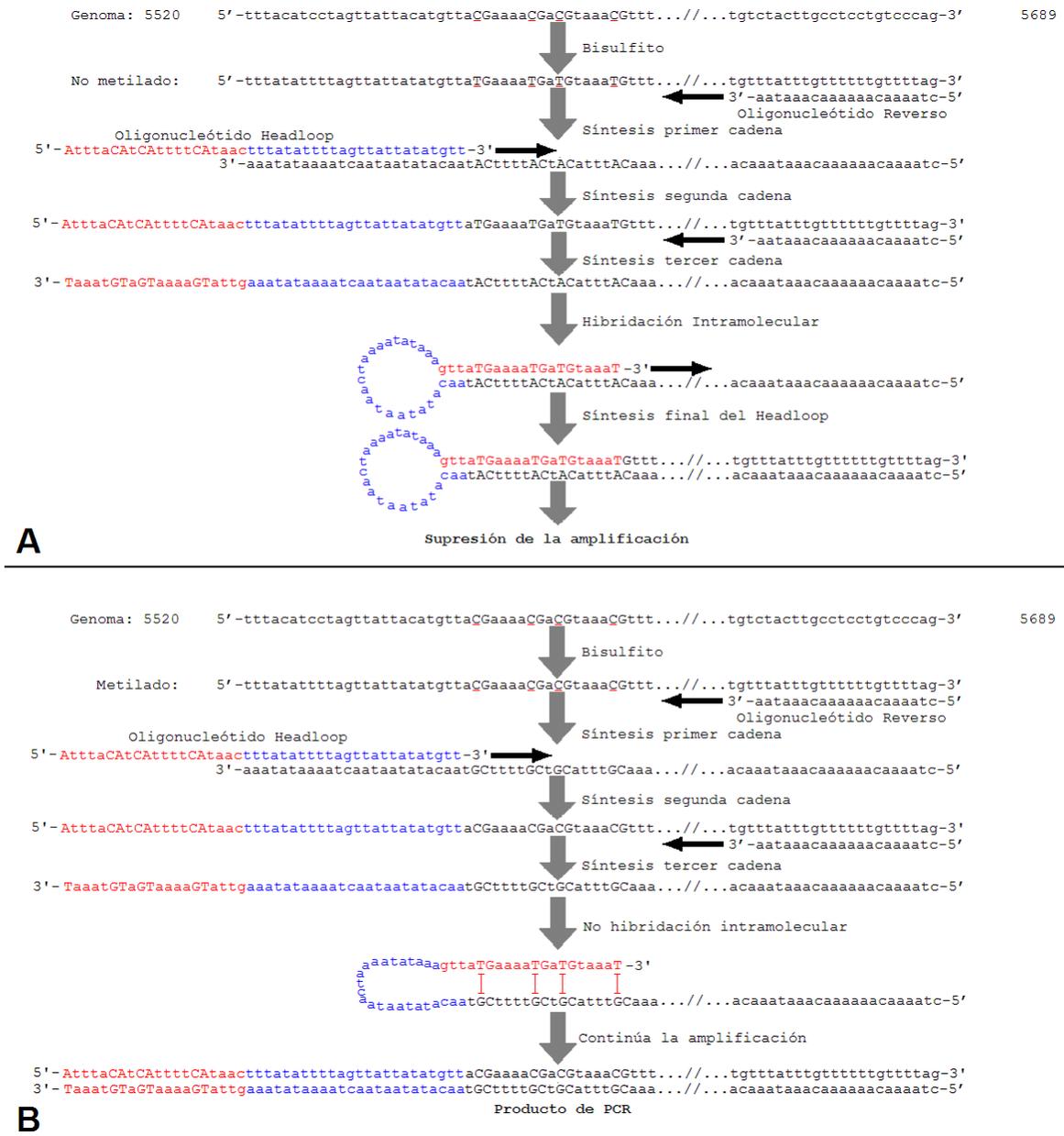


Figura 10. Supresión de la PCR por Headloop

El oligonucleótido Reverso está diseñado para hibridizar con el producto de la reacción con bisulfito. Tras la síntesis de la primer cadena (cebada por éste) el oligonucleótido *Headloop* reconoce su secuencia complementaria (en color azul) y ceba la síntesis de la segunda cadena, la que sirve como templado para una tercer cadena, la cual contiene una secuencia que es perfectamente complementaria a la cabeza (en color rojo) del *Headloop* (Panel A). Si no hay complementaridad de bases (las citosinas en cuestión se encuentran metiladas) (Panel B), la cabeza no hibridiza con su secuencia blanco, evitando la formación de la estructura de *hairpin* y permitiendo su amplificación en rondas subsiguientes

Dado que la hibridación intramolecular es muy rápida, se espera que ésta se lleve a cabo tras la desnaturalización, evitando el acceso de los cebadores y haciendo que esta molécula deje de ser un molde para otras amplificaciones. Esta metodología permite detectar la secuencia de interés (blanco) en presencia de un exceso de 10^4 secuencias relacionadas (competidora), e incluso, de 10^5 , con un límite de detección cercano a 25 pg (~4 células) (Rand *et al.*, 2005).

Esta eficiencia depende, entre otros parámetros, de la abundancia relativa de pares G·C o A·T, así como de la posición relativa de las bases que difieren entre las secuencias que se desea distinguir.



Justificación

“Suelen llamarse guerras justas las que vengan las injurias [...] las mismas guerras son pacíficas, pues se promueven no por codicia o crueldad, sino por deseo de paz, para frenar a los malos y favorecer a los buenos [...]

También quienes hacen la guerra justa intentan la paz.”

SANTO TOMÁS DE AQUINO. “SUMATEOLÓGICA” II-II QU. 40.

“En los más ilustres y gloriosos capitanes y emperadores del mundo, el estudio y la guerra han conservado la vecindad, y la arte militar se ha confederado con la lección. No ha desdeñado en tales ánimos la espada a la pluma.”

FRANCISCO DE QUEVEDO (1580-1645).

Algunas hiperplasias papilomatosas inducidas por tipos específicos de papilomavirus tienen un alto riesgo de progresión maligna, y todos los tipos virales que forman una especie junto con el HPV 16 (y algunas otras especies) son considerados de alto riesgo, y son encontrados en el cáncer cervical y las lesiones precursoras del mismo (de Villiers *et al.*, 2004). Entre las mujeres con citología normal la infección por HPV 16 es muy frecuente, siendo responsable por 30% de la positividad a virus de alto riesgo, y asociándose con mayor riesgo absoluto de desarrollo de lesiones de alto grado y cáncer a 10 años. Su presencia en lesiones precursoras es 9.4 veces mayor en comparación con mujeres con citologías normales (Bulk *et al.*, 2006). La infección por HPV 16 se asocia con un riesgo absoluto de \geq NIC II futura de 37% (CI 95%: 29-45) y de \geq NIC III futura de 28% (IC 95%: 21-36) (Naucler *et al.*, 2007). De forma similar, mujeres con carcinoma de células escamosas tienen una mayor prevalencia de infecciones por HPV 16 en relación con quienes tuvieron una citología normal. En conjunto, HPV 16 y 18 se asocian con un riesgo preferencial, en comparación con los otros virus de alto riesgo, para el desarrollo

de carcinoma de células escamosas o adenocarcinoma, de hecho, el altamente agresivo HPV 16 se ha asociado con ambos tipos de carcinoma (Bulk *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios de metilación del DNA viral en HPV 16 se han centrado en la *LCR* y la región 3' de *L1* (Badal, 2003; Kim *et al.*, 2003; Kalantari *et al.*, 2004; Wiley *et al.*, 2005; Bhattacharjee y Sengupta 2006; Kalantari *et al.*, 2008). Dos estudios han analizado el patrón de metilación de *L1* en lesiones precursoras y cáncer, pero éstos han sido realizados en HPV 18 (Turan *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2007) y ambos concluyeron que el incremento en la metilación de dicho gen, en este virus, podría representar un biomarcador de progresión. Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio en HPV 16 para determinar los patrones de metilación en la región *L2/L1* ni cómo éstos varían conforme las lesiones progresan hacia cáncer cervical. Adicionalmente, la aplicación de los cambios en el estado de metilación de esta región como un posible biomarcador de progresión, requiere del desarrollo de una herramienta sensible, específica, y de fácil implementación, características con las que cumple la técnica de Amplificación/Supresión selectiva de la PCR por *Headloops*.



Objetivo

“[...] pregunta sobre cuanto ve cómo se llama y para qué sirve.”

CHRÉTIEN DE TROYES “EL CUENTO DEL GRIAL”, 1180.

“[...] Entonces tendrás una pieza terminada en tu mente.

Cualquiera que tú quieras que sea completa y correcta.

Mantenla en tu mente, con seriedad y firmeza,
cuando te acerques al oponente, como si estuvieras tratando

de decir ‘¡Esto es lo que estoy intentando hacer!’ ”

HANKO DÖBRINGER. “FECHTBUCH COD.HS.3227A”, 1389.

Objetivo General

Analizar el patrón de metilación de cuatro dinucleótidos CpG (5602, 5608, 5611 y 5617) en la región *L2/L1* de HPV 16 en lesiones premalignas y cáncer cervicouterino, mediante la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR con *Headloops*.

Objetivos Particulares

- Determinar la sensibilidad absoluta (ng) de la amplificación con *Headloops* (en los 4 sitios).
- Determinar la sensibilidad relativa o especificidad (copias metiladas contra no metiladas) de la amplificación con *Headloops* (en los 4 sitios).
- Establecer el número mínimo (3, 2, 1) de dinucleótidos CpG que pueden ser analizados mediante esta técnica.
- Determinar capacidad de discriminación de la amplificación con *Headloops* de combinaciones de sitios metilados/no metilados (metilación mosaico).



Hipótesis

“La conjetura del sabio es más sólida que la certeza del ignorante.”

PROVERBIO ÁRABE.

“Previniendo los males a tiempo es posible remediarlos con facilidad;
pero si se deja que progresen, la enfermedad se tornará grave y
la medicina se aplicará a destiempo; como los médicos dicen del tísico:
al principio su mal es difícil de reconocer, pero fácil de curar;
si no es tratado a tiempo, después es fácil de reconocer, pero difícil de curar.”

NICOLÁS MAQUIAVELO. “EL PRÍNCIPE”. 1532.

Hipótesis de Trabajo

La metilación de cuatro dinucleótidos CpG (5602, 5608, 5611 y 5617) ubicados en la región *L2/L1* de HPV 16 incrementará conforme aumente el grado de las lesiones precancerosas, con hipermetilación franca en cáncer cervicouterino.



Material y Métodos

“Nadie debe pensar que este libro contiene conceptos falsos o erróneos, porque he eliminado las ambigüedades. Sólo he descrito las técnicas que he inventado, visto o intentado.”

FIORE DEI LIBERI “FLOS DUELLATORUM”, 1410.

“Quien pretenda conocer el afamado juego del ajedrez que escuche; como pude, en un poema lo compuse. Le contaré en pocos versos los combates del torneo”

ANÓNIMO. *QUI CUPIT EGREGIUM SCACHORUM LUDUM*, EN LOS “*CARMINA BURANA*”, S. XIII.

Amplificación, Clonación y Secuenciación de la Región L2/L1 de HPV 16

Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para amplificar la región *L2/L1* del HPV 16 (*L2L1F* y *L2L1R*, ver Tabla 2), tras modificación con bisulfito de sodio (ver más adelante). Con estos se amplificó la región comprendida entre los nucleótidos 5557 y 5853 del genoma viral mediante 40 ciclos de PCR: 30 seg a 94 °C; 30 seg a 53 °C; 45 seg a 68 °C, precedidos por una fase inicial de desnaturalización de 10 min a 94 °C y seguidos de una fase de extensión de 7 min a 68 °C. La reacción se preparó bajo las siguientes condiciones: En un volumen total de 20 µL, amortiguador para PCR, 1x; dNTPs, 0.32 mM; MgCl₂, 2.5 mM; Oligonucleótidos, 1 pM de cada uno; Ampli Taq Gold (Part No. 4311806. Applied Biosystems, CA, EUA), 0.04 U/µL; 50 ng DNA modificado con bisulfito.

En nuestro laboratorio previamente se aisló DNA proveniente de seis biopsias de cáncer bucal con presencia de HPV 16. Éste se modificó con bisulfito de sodio empleando el *EZ DNA Methylation Kit* (Cat. No. D5002. Zymo Research, CA, EUA). En breve, se agregan 5 µL de *M-Dilution Buffer* y agua (hasta un volumen de 50 µL) a 1 o 2 µg de DNA. Se incubó a 37 °C por 15 min y se agregan 150 µL de *CT Conversion Reagent* y se incubó en oscuridad a 50 °C por 12 a 16 h. Posteriormente, la muestra se incubó a 4 °C por 10 min.

A una columna se agregan 400 μL de *M-Binding Buffer* y se coloca en un tubo colector. Se carga la muestra y se mezcla por inversión. Se centrifuga a máxima velocidad por 30 seg y se descarta el contenido del colector. Se agregan 100 μL de *M-Wash Buffer* y se centrifuga a máxima velocidad por 30 seg. Se agregan 200 μL de *M-Desulphonation Buffer* y se centrifuga otros 30 seg. Se hacen dos lavados, cada uno con 200 μL de *M-Wash Buffer*, centrifugando por 30 seg. La columna se coloca en un tubo nuevo de 1.5 mL y se agregan 15 μL de *M-Elution Buffer*. Se centrifuga a máxima velocidad por 30 seg. En caso necesario, se puede repetir este paso una vez más.

Se empleó el par de oligonucleótidos L2L1F y L2L1R para amplificar la región bajo estudio y el producto de la reacción fue clonado usando el *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* (Cat. No. 45-0030. Invitrogen, CA, EUA). En un tubo de 0.5 mL se colocan los siguientes reactivos en el orden indicado: 2 μL de agua inyectable; 1 μL de sal (incluida en el Kit); 1 μL del vector TOPO; 2 μL de productos frescos de PCR (obtenidos hace menos de una semana). Se incubó a temperatura ambiente durante 20 a 30 min y se transfieren 5 μL de esta reacción en un tubo de 1.5 mL pre-enfriado donde ya se han alicuotado 25 μL de bacterias competentes (*E. coli* DH5 α), y se mezcla agitando suavemente. Este tubo se mantiene en hielo por 30 min y se colocan en un baño de agua a 42 °C por 40 seg. El tubo se coloca nuevamente en hielo por 2 min y se agregan 100 μL de medio SOC (incluido en el Kit) a temperatura ambiente. Se incubó con agitación (275 a 300 rpm) a 37 °C durante una hora. Se siembran 50 μL de las bacterias transformadas en cajas Petri (Agar LB + Kanamicina, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se incuban por 24 h a 37 °C. Se seleccionaron las clonas transformantes resistentes al antibiótico.

Se aislaron 100 colonias por biopsia y de cada una se amplificó una parte del vector con el inserto clonado usando el par de oligonucleótidos M13 (Tabla 2), bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de PCR, con 30 seg a 94 °C; 30 seg a 60 °C; 1 min a 72 °C; precedidos por una fase desnaturalización de 7 min a 94 °C, y seguidos por una fase final

de extensión de 7 min a 72 °C. Para 20 µL totales de reacción: amortiguador para PCR, 1x; MgCl₂, 2 mM; dNTPs, 0.2 mM; Oligonucleótidos, 0.4 pM de cada uno; Ampli Taq Gold, 0.04 U/µL.

Los productos de PCR se limpiaron usando el *QIAquick PCR Purification Kit* (Cat. No. 28106. QIAGEN, Hilden, Alemania), y se sometieron a reacción de secuenciación usando el *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Part No. 4336917. Applied Biosystems, CA, EUA) y las siguientes condiciones: 25 ciclos con 30 seg a 96 °C; 15 seg a 50 °C; 4 min a 60 °C; precedidos por una desnaturalización de 3 min a 94 °C. Amortiguador para secuenciación, 1x; Oligonucleótido M13R, 0.16 pM; *BigDye Terminator Mix*, 1.5 µL; H₂O, 2 µL; Producto purificado, 2.5 µL. Los productos de esta reacción se purificaron precipitando con etanol: a cada 10 µL de reacción de secuenciación se agregan 3 µL de acetato de sodio 3M pH 4.6, 32.5 µL de etanol 96%, y 14.5 µL de agua. Tras mezclar e incubar 15 min a temperatura ambiente, se centrifuga por 20 min a 13,000 rpm, se decanta el sobrenadante y se lava con 250 µL de etanol 70%, seguido por dos centrifugaciones de cinco min a 13,000 rpm. Se decanta y evapora el etanol residual. Se resuspende en 20 µL de formamida Hi-Di y se desnaturaliza a 96 °C durante 2 min, tras lo cual los tubos se colocan inmediatamente en hielo para cargarlos en la placa de secuencia. Los electroferogramas fueron obtenidos en un aparato ABI PRISM (Applied Biosystems, CA EUA) y se analizaron para determinar el estado de metilación de los sitios CpG 5602, 5608, 5611 y 5617 en las diversas clonas de cada biopsia para identificar clonas con distintos estados de metilación en cada sitio.

Una vez identificadas las colonias portadoras de plásmidos con los insertos de DNA viral con cuatro sitios metilados o desmetilados, éstas se resembraron en 500 mL de medio LB líquido adicionado con Kanamicina (50 µg/mL) y se crecieron por 24 h a 37 °C con agitación vigorosa (300 rpm). Se realizó la extracción de los plásmidos por lisis alcalina (*maxiprep*) con el kit *QUIAfilter* (Cat. No. 12263. QIAGEN, Hilden, Alemania). En breve: las bacterias se colectan centrifugando el cultivo a 6,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se

decanta el medio y el *pellet* se resuspende en 10 mL de *Buffer P1*. Se agregan 10 mL de *Buffer P2*, se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregan 10 mL de *Buffer P3* a 4 °C, se agita por inversión y la mezcla se coloca en el cartucho *QIAfilter* y se deja incubar a temperatura ambiente por 10 min. Con ayuda del émbolo, el lisado se pasa a una *QIAGEN-tip 500* previamente equilibrada con 10 mL de *Buffer QBT*. Se deja que el lisado entre a la columna por gravedad y se lava dos veces con 30 mL de *Buffer QC*. Finalmente, se eluye el DNA plasmídico con 15 mL de *Buffer QF*. El DNA se precipita agregando 0.7 volúmenes de isopropanol (a temperatura ambiente) y centrifugando a 11,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se decanta el isopropanol y se agregan 5 mL de etanol 70%. Se centrifuga a 11,000 rpm por 10 min. Se evapora el etanol residual y se resuspende el DNA plasmídico en 200 a 400 µL de agua inyectable.

Los plásmidos que contenían el fragmento de interés, cuyos cuatro sitios CpG estaban metilados (Plásmido M) o desmetilados (Plásmido U), fueron empleados para estandarizar las condiciones de amplificación/supresión de la PCR por *Headloop*. Los plásmidos con patrones de metilación mosaico (combinaciones de sitios metilados y desmetilados en un mismo molde) se extrajeron siguiendo el mismo protocolo y se emplearon para la estandarización frente a metilación mosaico.



Análisis Mediante Amplificación/Supresión de la PCR por Headloop

Se diseñaron diversos oligonucleótidos *Headloop* (Figura 11) para amplificar la región comprendida entre los nucleótidos 5576 y 5689 (*Headloops* 4M y 4U); 5570 y 5689 (3M y 3U); 5568 y 5689 (2M y 2U); 5565 y 5689 (1M y 1U).

```

5521 ctatagttcc agggctccca caatatacaa ttattgctga tgcagggtgac ttttatttac
5581 atcctagtta ttacatgtta CGaaaaCGaC GtaaaCGttt accatatttt ttttcAGATC
5641 tctctttggc tgccTAGtga ggccactgtc tacttgctc ctgtcccagt atctaaggtt

5561 tgcagggtgacttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaCGttt 5620
HEADLOOPS 4 SITIOS:
W      5' -tttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaC-3'
U      5' -tttatatttagttattatagttatGaaaaTGaTGtaaaT-3'
M      5' -tttatatttagttattatagttatGaaaaCGaCGtaaaC-3'
Head 4U      3' -caatACTtttACTACatttA-5'      Tm: 49° C
Head 4M      3' -aatGCTtttGCTGCatttG-5'      Tm: 59° C
Primer      5' -tttatatttagttattatagtt-3'      Tm: 47° C
Headloop 4U:      5' -AtttaCAtCAttttCAtaactttatattttagttattatagtt-3'      Producto 134 bps
Headloop 4M:      5' -GtttaCGtCGttttCGtaatttatattttagttattatagtt-3'      Producto 133 bps

5561 tgcagggtgacttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaCGttt 5620
HEADLOOPS 3 SITIOS:
W      5' -cttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaC-3'
U      5' -tttttatttatatttttagttattatagttatGaaaaTGaT-3'
M      5' -tttttatttatatttttagttattatagttatGaaaaCGaC-3'
Head 3U      3' -aatatacaatACTtttACTA-5'      Tm: 45° C
Head 3M      3' -atatacaatGCTtttGCTG-5'      Tm: 54° C
Primer      5' -tttttatttatatttttagttatta-3'      Tm: 47° C
Headloop 3U:      5' -AtCAttttCAtaacatataacttttatttatatttttagttatta-3'      Producto 140 bps
Headloop 3M:      5' -GtCGttttCGtaacatataacttttatttatatttttagttatta-3'      Producto 139 bps

5561 tgcagggtgacttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaCGttt 5620
HEADLOOPS 2 SITIOS:
W      5' -gacttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaC-3'
U      5' -gatttttatttatatttttagttattatagttatGaaaaT-3'
M      5' -gatttttatttatatttttagttattatagttatGaaaaC-3'
Head 2U      3' -caataatatacaatACTtttA-5'      Tm: 46° C
Head 2M      3' -aataatatacaatGCTtttG-5'      Tm: 49° C
Primer      5' -gatttttatttatatttttagtta-3'      Tm: 46° C
Headloop 2U:      5' -AttttcAatacatataataacgattttttatttatatttttagtta-3'      Producto 143 bps
Headloop 2M:      5' -GttttcGtaacatataataagattttttatttatatttttagtta-3'      Producto 142 bps

5561 tgcagggtgacttttatttacatcctagttattacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaCGttt 5620
HEADLOOPS 1 SITIO:
W      5' -ggtgacttttatttacatcctagttattacatgttaC-3'
U      5' -ggtgatttttatttatatttttagttattatagttatT-3'
M      5' -ggtgatttttatttatatttttagttattatagttatC-3'
Head 1U      3' -aaaatcaataatatacaatA-5'      Tm: 44° C
Head 1M      3' -aaaatcaataatatacaatG-5'      Tm: 47° C
Primer      5' -ggtgatttttatttatatttt-3'      Tm: 47° C
Headloop 1U:      5' -Aatacatataataactaaaagggtgatttttatttatatttt-3'      Producto 145 bps
Headloop 1M:      5' -Gtaacatataataactaaaagggtgatttttatttatatttt-3'      Producto 145 bps

REVERSE:
W      5' -ctaactgctcctgtcccag-3'
U      5' -ttatttgttttttgtttttag-3'
Complementaria      3' -aataaacaaaaaacaaaatC-5'
Reverse:      5' -ctaaaacaaaaaacaaaataa-3'      Tm: 49° C

```

Figura 11. Diseño de oligonucleótidos *Headloop*

En la parte superior de muestra un fragmento del genoma viral. Cuadro verde oscuro: región blanco de la secuencia cebadora de los *Headloops*. Cuadro azul: región blanco del oligonucleótido reverso. Cuadro amarillo: aceptor de *splicing*. Cuadro verde claro: codón de inicio de *L1*. Cuadro rojo: codón de paro de *L2*. W: secuencia original. U: secuencia tras conversión con bisulfito y sitios CpG desmetilados. M: secuencia tras tratamiento con bisulfito y sitios CpG metilados

Los *Headloops* están diseñados de modo tal, que pueden dirigir la amplificación del fragmento cuando los sitios CpG en cuestión están desmetilados (*Headloops* 4M, 3M, 2M y 1M) y suprimir la amplificación del mismo cuando están metilados; o bien, dirigir la amplificación cuando los sitios están metilados (*Headloops* 4U, 3U, 2U y 1U) y suprimirla cuando están desmetilados. En todos los casos se empleó un solo oligonucleótido reverso, HLR (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos

El número en el nombre de cada *Headloop* indica cuántos dinucleótidos CpG pueden ser analizados con ese oligonucleótido en particular. La letra M significa que el oligonucleótido está diseñado para suprimir la amplificación de moldes metilados, promoviendo la amplificación de las secuencias desmetiladas. La letra U significa que está diseñado para suprimir a los templates desmetilados y amplificar las secuencias metiladas. Las bases resaltadas con letras mayúsculas representan los elementos discriminatorios del *Headloop*

Oligonucleótido	Secuencia Cabeza 5'-3'	Secuencia Cebadora 5'-3'
<i>Headloop</i> 4M	GtttacGtcGttttcGtaa	tttatattttagttattatatggt
<i>Headloop</i> 4U	AtttacAtcAttttcAaac	tttatattttagttattatatggt
<i>Headloop</i> 3M	GtcGttttcGtaacatata	ttttatttatatttttagttatta
<i>Headloop</i> 3U	AtcAttttcAaacatataa	ttttatttatatttttagttatta
<i>Headloop</i> 2M	GttttcGtaacatataataa	gatttttattttatatttttagtta
<i>Headloop</i> 2U	AttttcAaacatataataac	gatttttattttatatttttagtta
<i>Headloop</i> 1M	Gaacatataaactaaaa	ggtgatttttattttatattt
<i>Headloop</i> 1U	Aaacatataaactaaaa	ggtgatttttattttatattt
HLR	-----	ctaaaacaaaaaacaataa
L2L1F	-----	gttgatgtaggtgattttta
L2L1R	-----	ataccctatattataatccta
M13F	-----	gtaaaacgacggccag
M13R	-----	caggaaacagctatgac

DNA Polimerasas

Se ensayó el efecto de diferentes polimerasas sobre la eficiencia de la Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloop*, a diferentes temperaturas de hibridación (T_m) (Eppendorf Mastercycler Gradient. Eppendorf, Alemania) con los 8 juegos de *Headloops*. Las enzimas evaluadas fueron la *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems, Cat. No. 4311806, NJ, EUA), *GoTaq Flexi DNA Polymerase* (Promega, Cat. No. M8296, WI, EUA) y *Pfu* DNA polimerasa (Altaenzymes, Canadá, salvo donde se especifica). Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: Para 20 μ L totales de reacción: Amortiguador

de reacción (específico para cada enzima) 1X; [MgCl₂], 2 mM; [dNTPs], 2 mM c/u; [Oligonucleótidos], 100 nM c/u; [DNA polimerasa], 0.25 U/μL; DNA, 50 ng (Plásmidos M o U). Esta mezcla se sometió a una fase de desnaturalización a 95 °C por 120 seg, seguida por 30 ciclos de PCR: 95 °C por 15 seg; Curva de T_m por 30 seg; extensión a 68 °C por 60 seg.

Temperatura de Hibridación (T_m)

Se llevaron a cabo curvas de T_m entre 39 y 55 °C para todos los *Headloops*, a fin de determinar la temperatura de hibridación que brindase las mejores condiciones de amplificación (*Headloops* M + Plásmido U; *Headloops* U + Plásmido M) y de supresión (*Headloops* M + Plásmido M; *Headloops* U + Plásmido U).

Concentración de Iones Mg²⁺

Se realizaron curvas de MgSO₄ (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mM) para todos los *Headloops*, a fin de determinar la concentración que proporciona la mejor discriminación, en cada caso. En este ensayo se empleó la *Pfu* DNA polimerasa de la casa comercial Fermentas (Cat. No. EP0509), por ofrecer la ventaja de permitir ajustar la concentración de este ion.

Cantidad de DNA Blanco

Se evaluó el efecto de la cantidad de DNA blanco (plásmidos M y U: 10, 50, 100 y 200 ng totales) sobre la amplificación/supresión de la PCR para los *Headloops* 4M y 4U.

Concentración del Headloop

Se evaluó el efecto de la concentración de los oligonucleótidos *Headloops* 4M y 4U sobre la amplificación/supresión de la PCR. Las concentraciones ensayadas fueron: 50, 100, 150 y 200 nM.

Número de Ciclos de PCR

Se evaluó el efecto del número de ciclos de Amplificación/Supresión para los *Headloops* 4M y 4U. Los ciclos ensayados fueron: 20, 30, 40 y 45.

Sensibilidad de los Headloops 4M y 4U

Se diseñaron experimentos de amplificación (*Headloop* 4M + plásmido U; *Headloop* 4U + plásmido M) para determinar la cantidad mínima de secuencia blanco que puede ser detectada. En un primer experimento se diluyeron en agua cantidades decrecientes de los plásmidos M y U (50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, y 0.001 ng). En otro se diluyeron (100, 50, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0 ng) en un fondo de DNA de timo de ternera (suficiente para un total de 200 ng de DNA). En un tercer experimento se diluyeron (200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 10, 5, 1, 0 ng) en un fondo del plásmido pBR322 (suficiente para un total de 200 ng de DNA).

Para 20 μ L totales de reacción: Amortiguador de reacción 1X; [MgCl₂], 2 mM; [dNTPs], 2 mM c/u; [Oligonucleótidos], 100 nM c/u; [*Pfu* DNA polimerasa], 0.25 U/ μ L; DNA, 200 ng (totales). Esta mezcla se sometió a una fase de desnaturalización a 95 °C por 120 seg, seguida por 30 ciclos de PCR: 95 °C por 15 seg; 49 °C por 30 seg; 68 °C por 60 seg.

Especificidad de los Headloops 4M y 4U

Se evaluó la especificidad de los *Headloops* 4M y 4U para amplificar sus respectivas secuencias blanco, en presencia de un exceso de la secuencia competidora. Para tal fin se ensayaron diversas cantidades de secuencia blanco (0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 190, 195, 199 y 200 ng) en presencia de la competidora (suficiente para un total de 200 ng de DNA); así como diluciones seriales de la secuencia blanco en la secuencia competidora (1:10, 1:100, 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶), para un total de 50 ng.

Para 20 μ L totales: amortiguador de reacción 1X; [MgCl₂], 2 mM; [dNTPs], 2 mM c/u; [Oligonucleótidos], 100 nM c/u; [*Pfu* DNA polimerasa], 0.25 U/ μ L; DNA, según

experimento. Esta mezcla se sometió a una fase de desnaturalización a 95 °C por 120 seg, seguida por 30 ciclos de PCR: 95 °C por 15 seg; 49 °C por 30 seg; 68 °C por 60 seg.

Metilación Mosaico

A fin de determinar el efecto que un patrón heterogéneo de metilación (metilación mosaico) tiene sobre el desempeño de los *Headloops*, entre las colonias transformantes se identificaron aquellas cuyos fragmentos *L2/L1* tuviesen patrones heterogéneos (ver Tabla 4). Cada plásmido fue aislado y empleado como molde frente a los *Headloops* 4M y U, 3M y U.

Metilación en Biopsias y Líneas Celulares

El DNA proveniente de muestras clínicas de lesiones de diversos grados (NIC I, NIC y NIC III) fue tratado con bisulfito de sodio y sometido a la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops*, empleando los *Headloops* 4M y 4U. Para 20 μ L totales: amortiguador de reacción 1X; [MgCl₂], 2 mM; [dNTPs], 2 mM c/u; [Oligonucleótidos], 100 nM c/u; [*Pfu* DNA polimerasa], 0.25 U/ μ L; DNA, 25 – 100 ng, según disponibilidad de la muestra. Esta mezcla se sometió a una fase de desnaturalización a 95 °C por 120 seg, seguida por 30 ciclos de PCR: 95 °C por 15 seg; 49 °C por 30 seg; 68 °C por 60 seg. Estas mismas muestras se amplificaron con los oligonucleótidos L2L1F y L2L1R como ya se ha descrito; 1 μ L del producto de esta reacción se sometió a Amplificación/Supresión por *Headloop* anidada, con los *Headloops* 4M, 4U, 3M y 3U, bajo las condiciones establecidas.

Tratamiento de Residuos de Bromuro de Etidio

Los residuos de bromuro de etidio (geles de agarosa, puntas) se trataron de acuerdo con el método de Quillardet y Hoffnung: en caso necesario, se diluye con agua hasta llevar la concentración de bromuro de etidio a menos de 0.5 mg/mL. Se agrega un volumen de

KMnO₄ 0.05M y se mezcla. Se adiciona un volumen de HCl 0.25 N y se mezcla cuidadosamente. Se permite que la mezcla repose a temperatura ambiente durante varias horas (normalmente 12 a 24 h) y se neutraliza con un volumen de NaOH 0.25 N. La solución se descarta en la tarja y los sólidos en la basura normal (Bloom *et al.*, 1996).



Resultados

“Entonces he empezado a llevar frutos
y a conocer muchas cosas,
a crecer y a prosperar mucho:
Palabra por palabra
he buscado las palabras,
hecho por hecho
He buscado los hechos.”

ANÓNIMO NÓRDICO ESCANDINAVO. “LOS DICHOS DE HAR (HÁVAMÁL)” EN LA EDDA MAYOR, S X D. C.

“Juremos hacerlo así, mi buen amigo,
sea la suerte flaca para el uno, y mejor para el otro.”

ANÓNIMO INGLÉS. “SIR GAWAIN Y EL CABALLERO VERDE”, S XIV D. C.

Obtención y Verificación de Moldes

Amplificación del Vector TOPO con el Inserto L2/L1 (PCR de Colonias)

Posterior a la clonación, se realizó la amplificación del inserto (296 bps + 133 bps de vector) de cada colonia usando el par de oligonucleótidos M13F y M13R a fin de identificar las clonas en las que se encontrase presente el fragmento *L2/L1*, observándose una eficiencia cercana a 100% (Figura 12). La secuenciación de estos productos permitió establecer la presencia de patrones de metilación generalmente homogéneos (Figura 23 y Tabla 3). Se identificaron las clonas donde se encontrasen los cuatro sitios CpG de interés metilados (Plásmido 4M) y desmetilados (Plásmido 4U), así como otros patrones relevantes. Estas clonas fueron propagadas y sus respectivos plásmidos aislados, para la obtención de moldes.

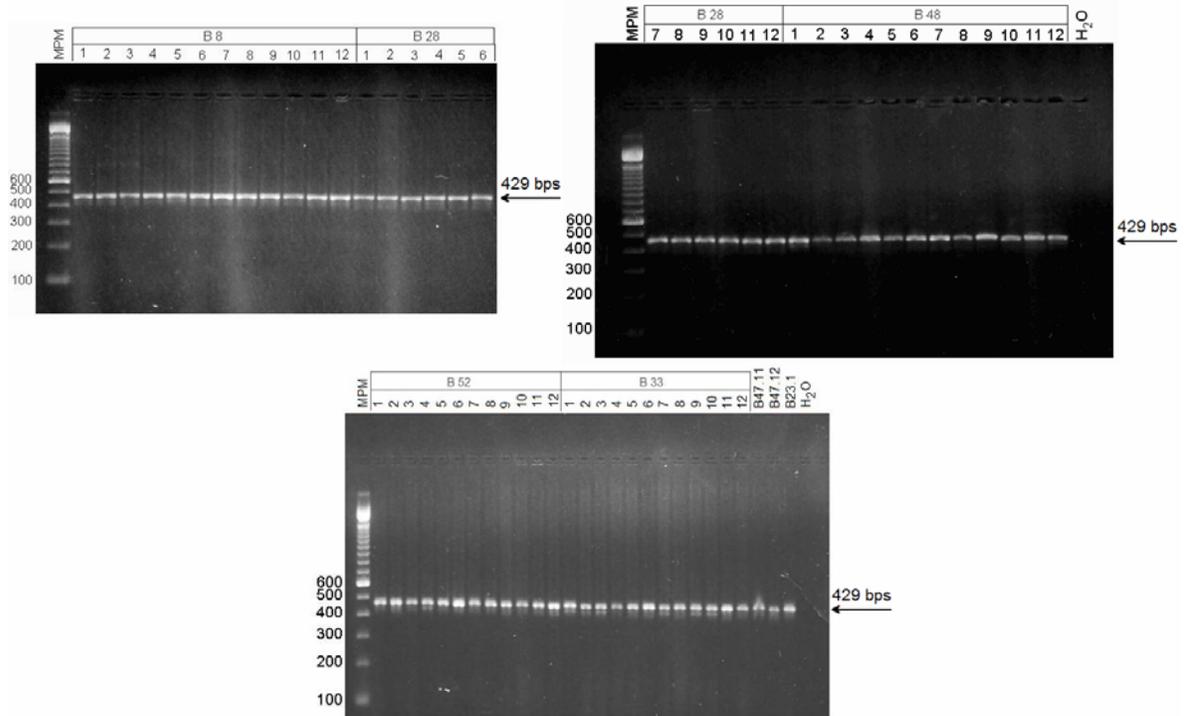


Figura 12. La región *L2/L1* se clonó con alta eficiencia en el vector TOPO TA (PCR de Colonias)

En la parte superior se indica el número de cada colonia, así como las biopsias a las que éstas corresponden.

Se observa la presencia del inserto en todas las clonas aquí analizadas.

MPM: marcador de peso molecular; H₂O: control negativo de amplificación



Condiciones que Afectan la Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* con Distinto Número de Sitios Metilados o no Metilados

Pfu DNA Polimerasa Ofrece la Mejor Discriminación

Dado que la *Taq* DNA polimerasa tiende a agregar adeninas en los extremos 3' de sus productos, de forma independiente del molde, se ensayaron tres DNA polimerasas, por ver si el desempeño de los *Headloops* es distinto debido a esta característica de la *Taq*, o si existen diferencias entre marcas de *Taq*. Las enzimas evaluadas fueron: *Pfu* DNA Polimerasa, proveniente de *Pyrococcus furiosus*, y dos marcas comerciales de *Taq* DNA Polimerasa, proveniente de *Thermus aquaticus* (*Taq* Gold y *GoTaq Flexi*) (Figura 13). Las tres enzimas son capaces de realizar la amplificación del producto deseado. No obstante, la supresión se da sólo con *Pfu* en presencia de los *Headloops* 4M y 3M, y en menor medida, 2M; así como para los *Headloops* 4U y en menor medida, 3U (Figura 13). Por lo tanto, la *Pfu* DNA polimerasa ofrece la mejor discriminación y fue elegida para ser empleada en los experimentos subsecuentes.

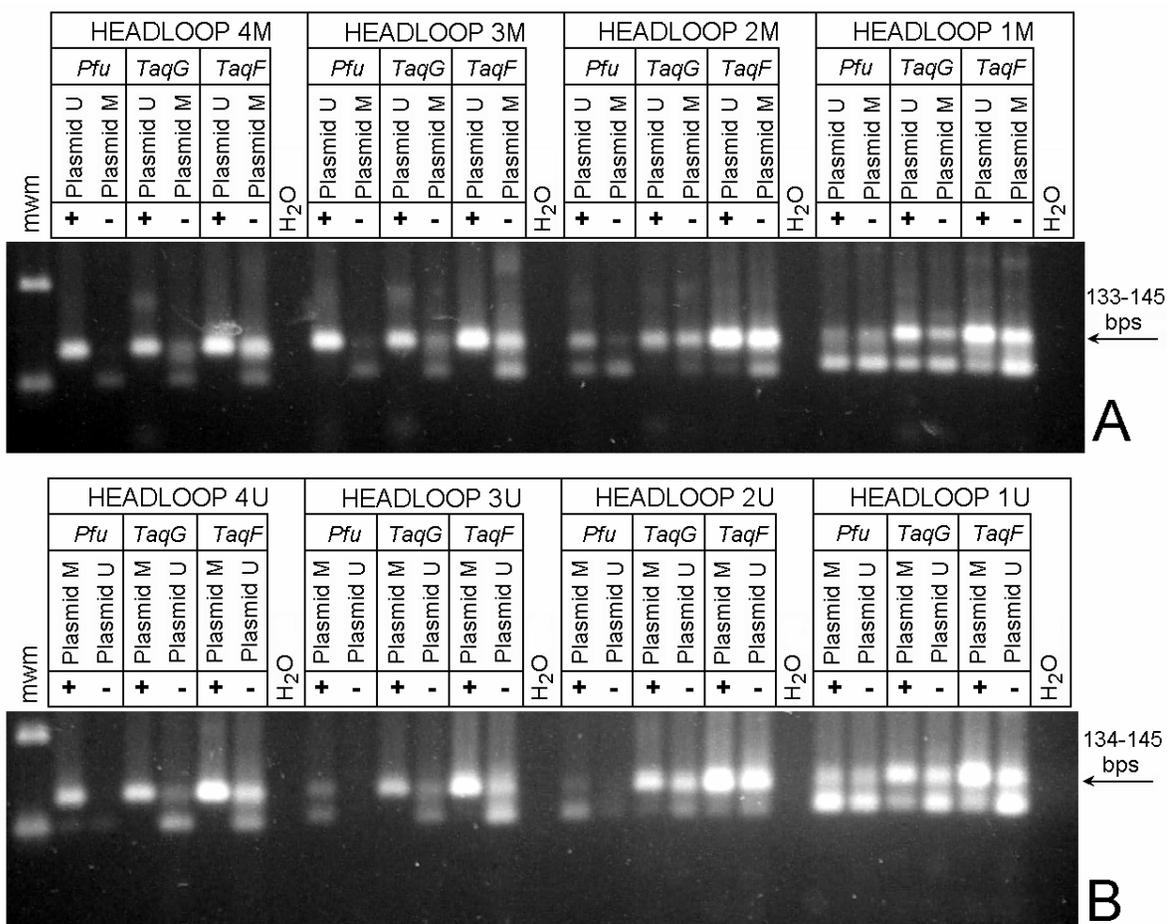


Figura 13. *Pfu* DNA polimerasa tiene el mejor desempeño en la Amplificación/Supresión por Headloops

Desempeño de la *Pfu* DNA Polimerasa vs. TaqGold DNA Polimerasa y GoTaq Flexi, en la amplificación (signos +) (*Headloops* M + Plásmido U; *Headloops* U + Plásmido M) y supresión (signos -) (*Headloops* M + Plásmido M; *Headloops* U + Plásmido U). **A.** *Headloops* 4M a 1M. **B.** *Headloops* 4U a 1U. mwm: marcador de pesos moleculares. H₂O: control negativo. Cada oligonucleótido se ensayó en su T_m óptima (ver Figura 17)

La Temperatura de Hibridación (T_m) Afecta de Forma Significativa el Desempeño de los Headloops

Se ensayaron diversas T_m's para todos los *Headloops*, ya que éste es un parámetro crítico para el adecuado funcionamiento de los oligonucleótidos. En buena medida es ella quien determina la estabilidad de la estructura de *Hairpin* en aquellas instancias donde debe haber supresión. Dado el tratamiento con bisulfito, con la consecuente pérdida de pares C·G en la secuencia, las T_m's suelen ser bajas (< 50 °C). La temperatura de

hibridación óptima para los *Headloops* 4M y 4U fue de 49 °C, para los 3M y 3U fue de 47 °C, para los 2M y 2U fue de 42 °C. Los *Headloops* 1M y 1U carecen completamente de capacidad de discriminación, independientemente de la T_m que se utilice (Figura 14).

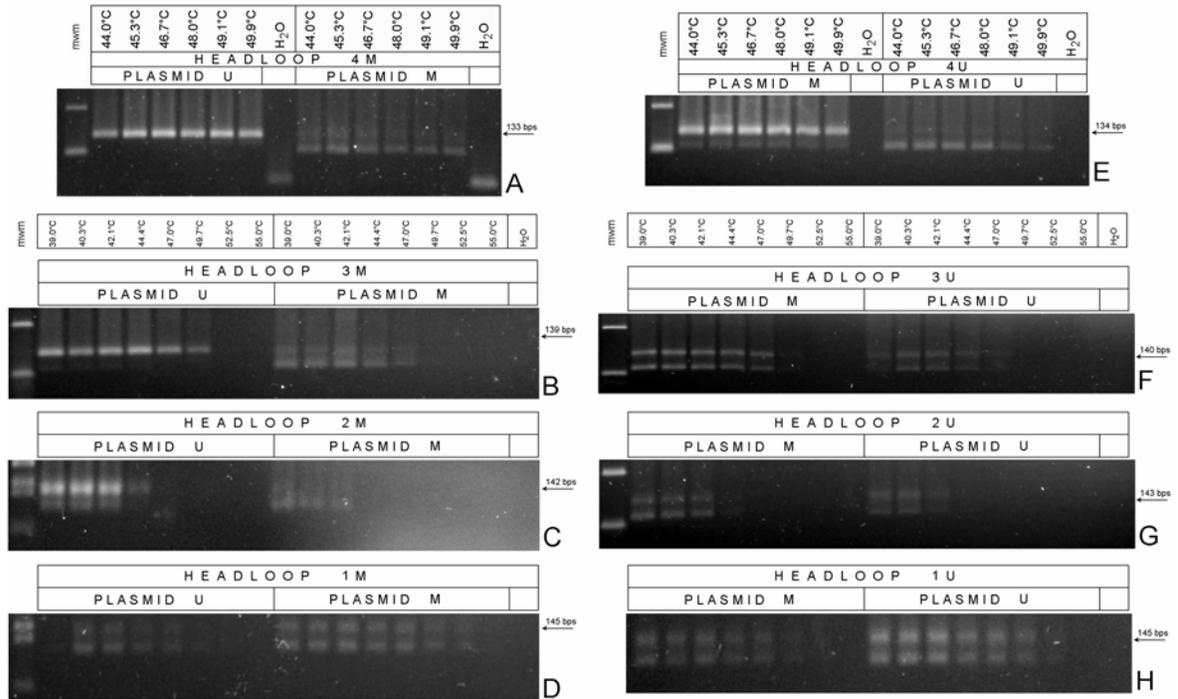


Figura 14. La T_m afecta significativamente la capacidad de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops*

A, B, C y D. Curvas de T_m para Amplificación (*Headloops* M + Plásmido U) y Supresión (*Headloops* M + Plásmido M) de los *Headloops* 4M a 1M, respectivamente. **E, F, G y H.** Curvas de T_m para la Amplificación (*Headloops* U + Plásmido M) y Supresión (*Headloops* U + Plásmido U) de los *Headloops* 4U a 1U, respectivamente. mwm: marcador de pesos moleculares; H₂O: control negativo; En **A y E** se ensayaron T_m's de 44 a 49.9 °C; en **B-D y F-H** se ensayaron T_m's de 39 a 55 °C

La Concentración Óptima de Iones Mg²⁺ es de 2 mM

Se realizaron curvas de [MgSO₄] para todos los *Headloops* M y *Headloops* U (Figura 18). Las concentraciones empleadas estuvieron en el rango de 0.5 mM a 2.0 mM. En todos los casos, la amplificación (*Headloops* M + Plásmido U; *Headloops* U + Plásmido M) óptima se obtuvo con una [MgSO₄] de 2.0 mM; no obstante, la supresión (*Headloops* M + Plásmido M; *Headloops* U + Plásmido U) sólo se obtuvo para los *Headloops* 4M, 3M y 2M;

y 4U, y en menor medida, para 3U y 2U. Independientemente de la concentración de $MgSO_4$, los Headloop 1M y 1U no presentaron supresión de la PCR (Figura 15).

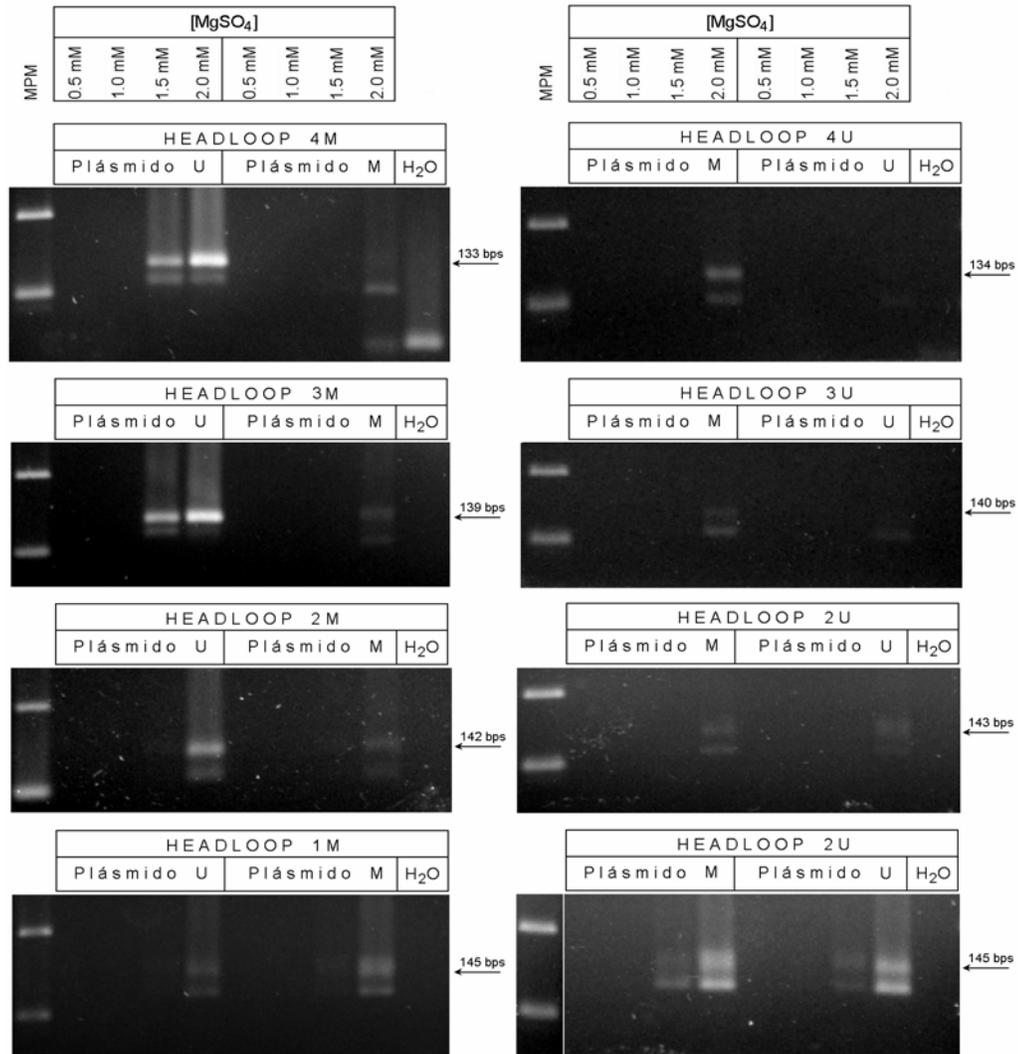


Figura 15. La concentración óptima de iones Mg^{2+} para los *Headloops* M y U es de 2.0 mM

En la parte superior se indica la concentración de $MgSO_4$ en cada reacción. En cada experimento se indica el *Headloop* evaluado, así como el Plásmido usado. La flecha señala el producto de PCR (amplificación). H₂O: control negativo. MPM: Marcador de Pesos Moleculares (escalera de 100 bp)

Cantidad de DNA Blanco

Se determinó el efecto de la cantidad de plásmido utilizado en las reacciones de Amplificación y Supresión de la PCR para los *Headloops*, 4M y 4U con dos T_m's diferentes (Figura 16). Se determinó que cantidades elevadas de la secuencia blanco (200

ng) o reducidas (10 ng) disminuyen la eficiencia de la amplificación. Por otro lado, cantidades elevadas de la secuencia competidora (no deseada) favorece la producción de mayores cantidades de la estructura de *hairpin* (suprimida). Dados estos resultados, se eligió una cantidad de DNA blanco de 50 ng como la óptima para experimentos subsecuentes.

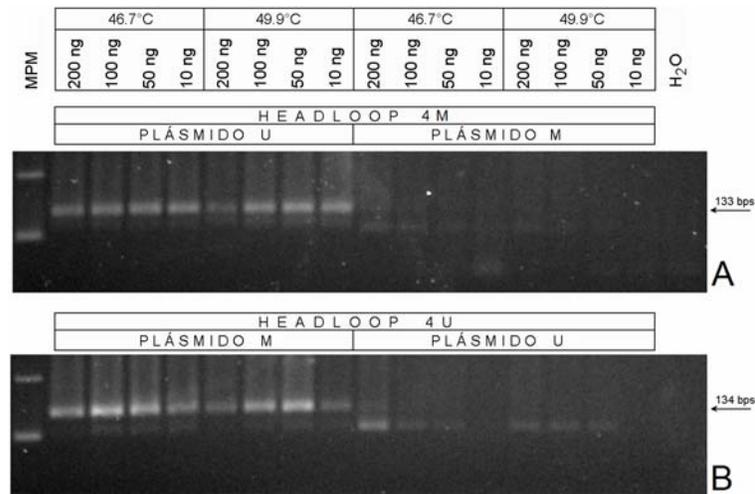


Figura 16. Los Headloops 4M y 4U presentan buen desempeño con 50 ng de DNA blanco
 Por cada oligonucleótido se ensayaron 4 cantidades del plásmido y dos Tm, indicadas en la parte superior de la figura. **A.** Headloop 4M; **B.** Headloop 4U. MPM: marcador de pesos moleculares. H₂O: Control negativo

Concentración del Headloop

Se realizaron curvas de concentración de los oligonucleótidos, con 50 nM a 200 nM de los Headloops 4M y 4U, a fin de determinar el efecto que la concentración de los mismos juega sobre la amplificación y supresión (Figura 17). Se ensayaron 3 Tms, y la concentración que se determinó como óptima para ambos nucleótidos fue de 100 nM, a 49 °C. Concentraciones superiores a ésta favorecen la producción de la estructura de *Hairpin*, mientras que concentraciones inferiores reducen ligeramente la eficiencia de la amplificación.

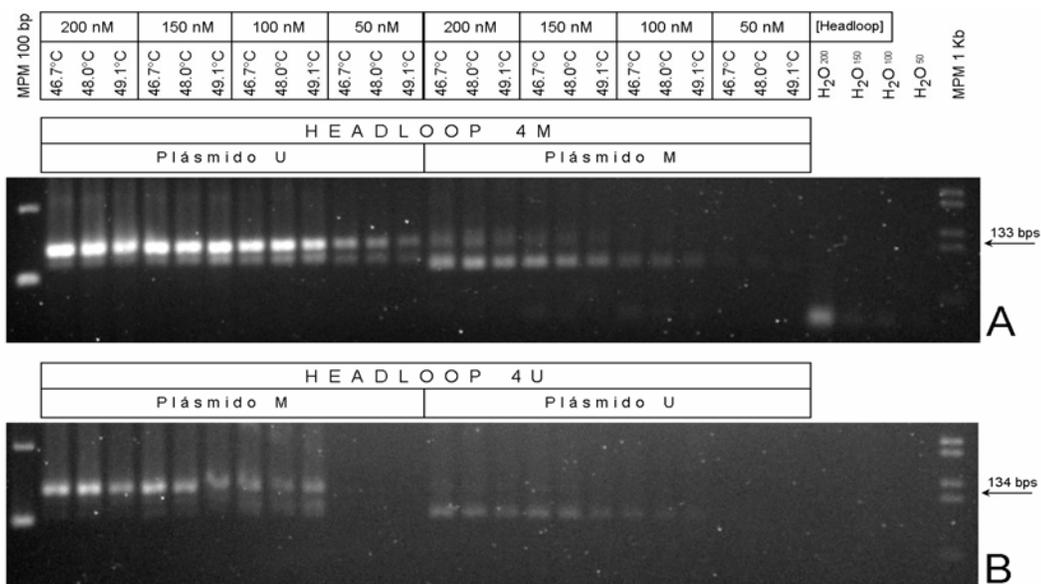


Figura 17. La concentración óptima de los Headloops 4M y 4U es de 100 nM

Las concentraciones de los Headloops y las Tm se indican en la parte superior de la figura. MPM 100 bp: marcador de pesos moleculares, escalera de 100 bps; MPM 1 Kb: marcador de pesos moleculares, 100 bps.

H₂O: controles negativos para cada concentración del Headloop

Número de Ciclos de PCR

Se determinó el número de ciclos de PCR que ofrece discriminación óptima, con los Headloops 4M y 4U (Figura 18). Treinta ciclos proporcionan máxima amplificación y mínima acumulación del producto de la supresión. Un mayor número de ciclos no redundaba en más producto de PCR, no obstante, sí incrementa la acumulación del producto de la supresión, incluso en las reacciones donde sólo se espera amplificación.

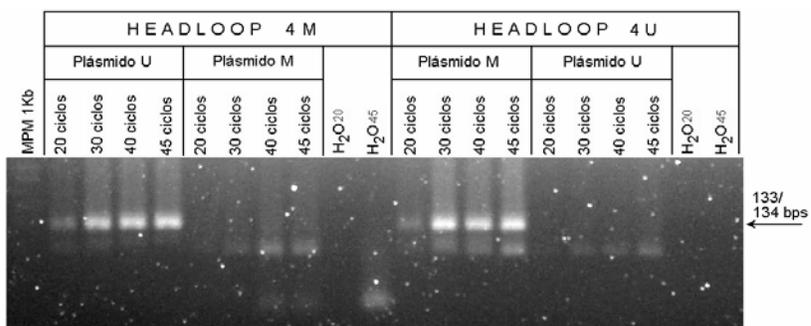


Figura 18. Treinta ciclos de PCR proporcionan la Amplificación/Supresión óptimas

Se evaluaron cuatro condiciones (20, 30, 40 y 45 ciclos) para la amplificación (Headloop 4M + U;

Headloop 4U + M) y la supresión (Headloop 4M + M; Headloop 4U + U)



Sensibilidad y Especificidad de los *Headloops* 4M y 4U

Sensibilidad

Se evaluó el límite inferior de detección (sensibilidad) de los *Headloops* 4M y 4U, diluyendo cantidades decrecientes de los plásmidos blanco en agua (Figura 19A). No obstante, dado que las secuencias virales a ser detectadas por los *Headloops* se encuentran en presencia de DNA genómico del hospedero, es importante evaluar el efecto que la presencia de DNA diferente de la secuencia blanco tiene sobre el desempeño de los *Headloops*. Con tal fin se diluyeron cantidades decrecientes de los plásmidos blanco en un fondo de DNA de timo de ternera (Figura 19B) y cantidades crecientes de otro plásmido (pBR322) (Figura 19C).

Mientras que el límite de detección, cuando la secuencia blanco está diluida en agua es de 0.1 y 5 ng para los *Headloops* 4M y 4U, respectivamente, el límite de detección cae hasta 10 y 50 ng, respectivamente, en presencia de DNA genómico, y hasta 75 y 100 ng en presencia de un plásmido que no contenga la secuencia blanco (Figura 19).

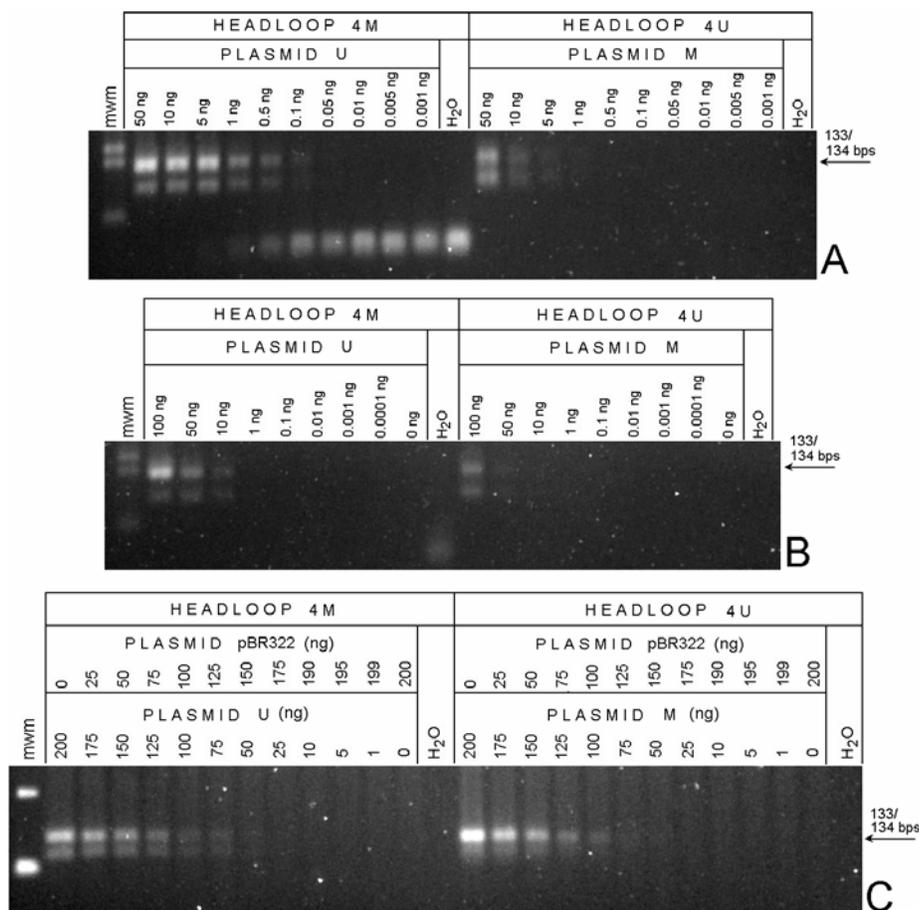


Figura 19. La sensibilidad de los *Headloops* 4M y 4U disminuye en presencia de DNA diferente a la secuencia blanco

Se diseñaron experimentos dirigidos a la amplificación de la secuencia blanco. En la parte superior de cada figura se indica la cantidad total de plásmido (M o U) incorporado en cada reacción. **A.** Límite de detección cuando la secuencia blanco está diluida en agua. **B.** Límite de detección en un fondo de DNA genómico (DNA de timo de ternera). En todas las reacciones se incorporó un total de 200 ng de DNA (plásmido + ternera). **C.** Límite de detección en un fondo de DNA plasmídico (pBR322). En todas las reacciones se incorporó un total de 200 ng de DNA (plásmido M o U + pBR322). mwm: marcador de pesos moleculares.

H₂O: controles negativos

Especificidad

Se determinó la especificidad de los *Headloops* 4M y 4U para amplificar su secuencia blanco y suprimir la amplificación de la secuencia competidora, en cantidades decrecientes de la primera y crecientes de la segunda (Figuras 20A y 20B). En el caso de ambos *Headloops* se encontró que es posible detectar hasta 5 ng de secuencia blanco en un fondo de 195 ng de secuencia competidora.

Mediante diluciones seriales se ensayó la capacidad de cada *Headloop* para amplificar cantidades decrecientes de su secuencia blanco en presencia de una cantidad constante de la secuencia competidora (Figura 20C). El presente acercamiento, de PCR en tiempo final, permite detectar adecuadamente, hasta 1 copia en un fondo de 100 copias.

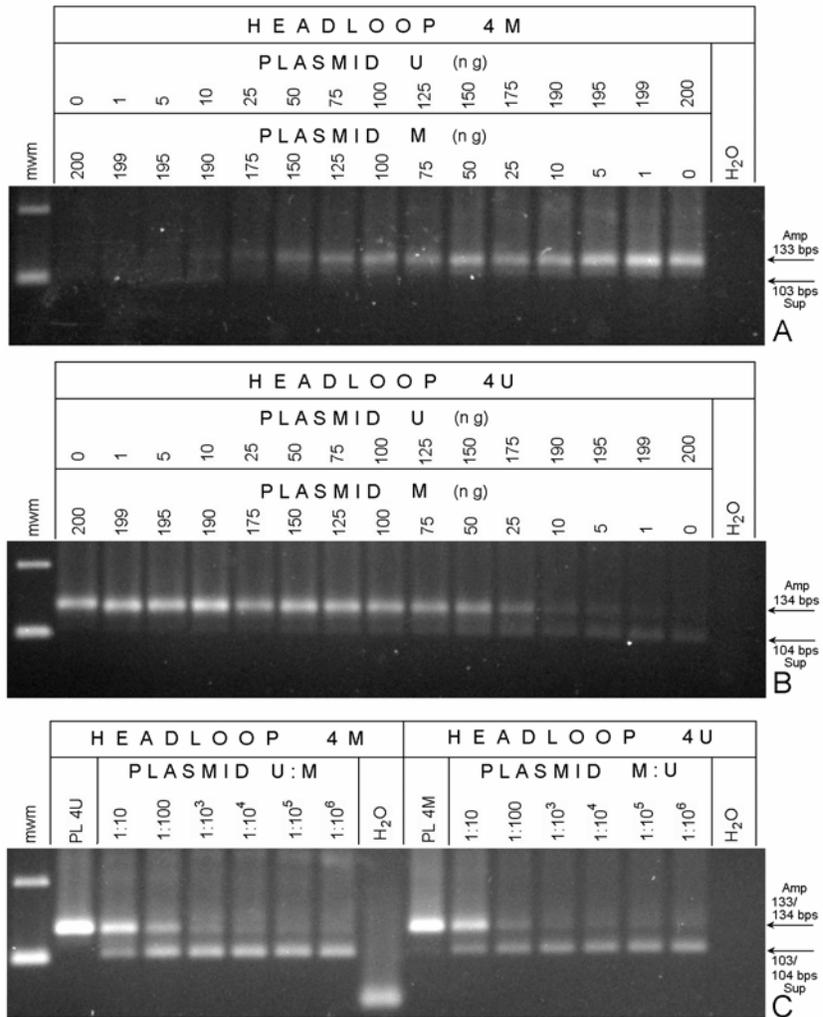


Figura 20. Los Headloops 4M y 4U pueden detectar 1 copia de secuencia blanco en un fondo de 100 copias de secuencia competidora

A. Se emplearon cantidades crecientes del plásmido blanco (U) con cantidades decrecientes del plásmido competidora (M), con un total de 200 ng de DNA por reacción. **B.** Se emplearon cantidades decrecientes del plásmido blanco (M) con cantidades crecientes del plásmido competidor (U), con un total de 200 ng de DNA por reacción. **C.** Se hicieron diluciones seriales de cada plásmido blanco, en cantidades constantes del respectivo plásmido competidor, con un total de 200 ng de DNA por reacción. mwm: marcador de pesos moleculares. H₂O: controles negativos. En todas las figuras se indica el producto de la Amplificación (Amp: flechas superiores) y de la Supresión (Sup: flechas inferiores)



Metilación Mosaico

Dado que el DNA viral tiende a estar presente en un número variable de copias (ya sea en forma episomal o integrado), existe la posibilidad de que no todas ellas posean el mismo patrón de metilación, sino que exista una variedad de patrones (metilación mosaico) de una a otra. Los plásmidos que contenían los diversos patrones identificados (Tabla 4) fueron aislados y empleados para determinar el efecto de la metilación mosaico sobre el desempeño de los ocho *Headloops*: 4M, 4U, 3M, 3U, 2M, 2U, 1M y 1U (Figura 21).

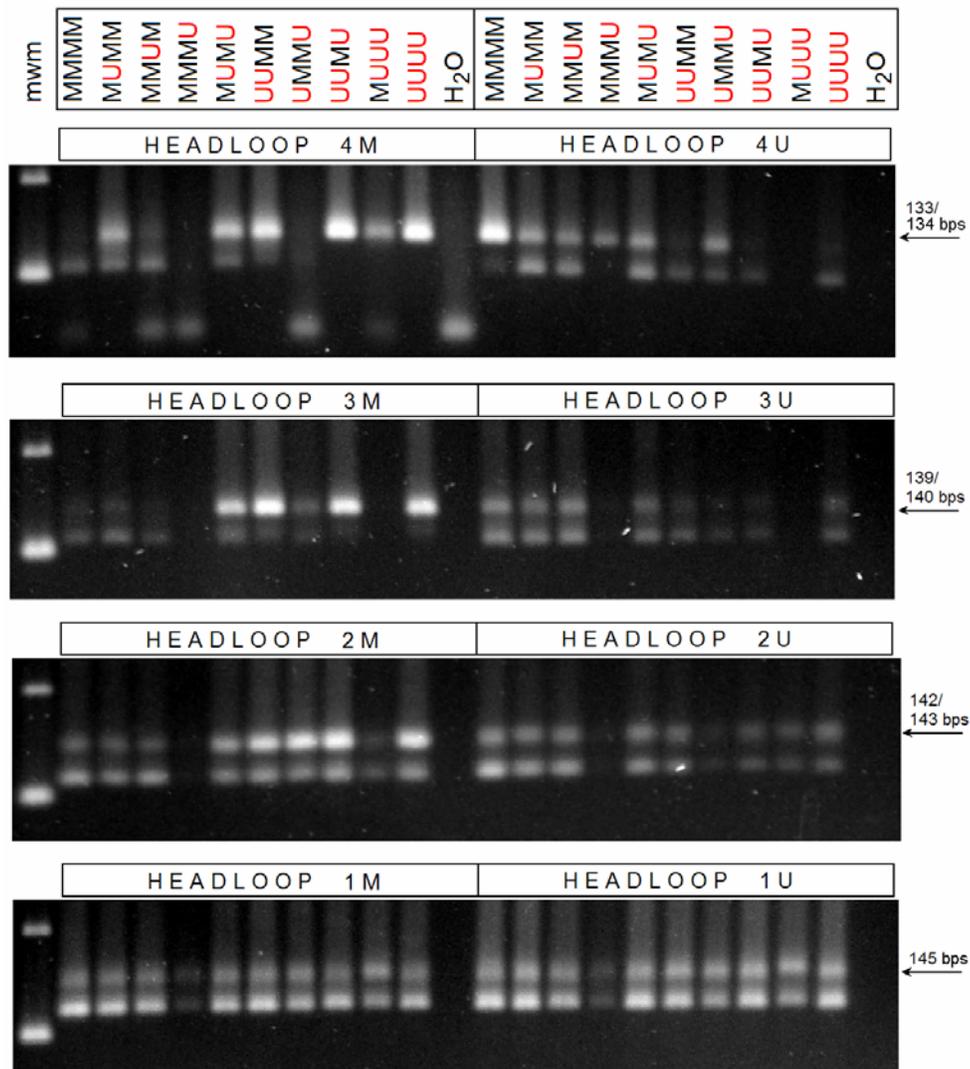


Figura 21. El efecto de la metilación mosaico sobre el desempeño de los *Headloops* es altamente dependiente del contexto de los desapareamientos

Se emplearon los mismos patrones de metilación mosaico en todos los experimentos, con fines comparativos. Los patrones se indican en la parte superior de la figura (M: CpG metilado; U: desmetilado). mwm: marcador de pesos moleculares. H₂O: controles negativos. Las flechas indican el producto de la amplificación

Como puede observarse, la capacidad de discriminación de los *Headloops* incrementa en forma proporcional al número de bases incluidas en la Cabeza (extremo 5' del oligonucleótido). Por lo tanto, los *Headloops* 2M, 2U, 1M y 1U, no poseen capacidad de discriminación, la cual se ve ya dramáticamente reducida en el caso del *Headloop* 3U, aunque su contraparte M aún conserva cierta capacidad de discriminación.



Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* en Biopsias y Líneas Celulares Derivadas de Cáncer Cervicouterino

DNA de biopsias de pacientes con lesiones del cuello uterino de diferentes grados (CIN I, II y III), de líneas celulares con HPV 16 (CaSki, SiHa), así como de una línea celular control (HeLa: HPV 18) fue obtenido. Este DNA, al igual que DNA de timo de ternera se trató con bisulfito de sodio y se sometió a la reacción de amplificación/supresión de la PCR con los *Headloops* 4M y 4U. No se observó producto de amplificación (Figura 22A y 22E), por lo que estas muestras se sometieron a amplificación con el par de oligonucleótidos L2L1F y L2L1R (Figura 22B), cuyos productos fueron sometidos a una reacción anidada con los *Headloops* 4M, 4U, 3M y 3U (Figuras 22C, 22F, 22D y 22G, respectivamente).

Mediante este análisis es posible determinar la presencia de copias desmetiladas en prácticamente la totalidad de las muestras (Figura 22C). En contraste, la cantidad de copias metiladas se correlaciona con el grado de la lesión. Mientras que en las lesiones NIC I no se observan bandas correspondientes a copias metiladas, en lesiones NIC II es posible apreciar bandas de muy baja intensidad, y en todas las lesiones NIC III analizadas se observan bandas correspondientes a la presencia de copias metiladas, al igual que en las líneas celulares CaSki y SiHa (Figura 22F).

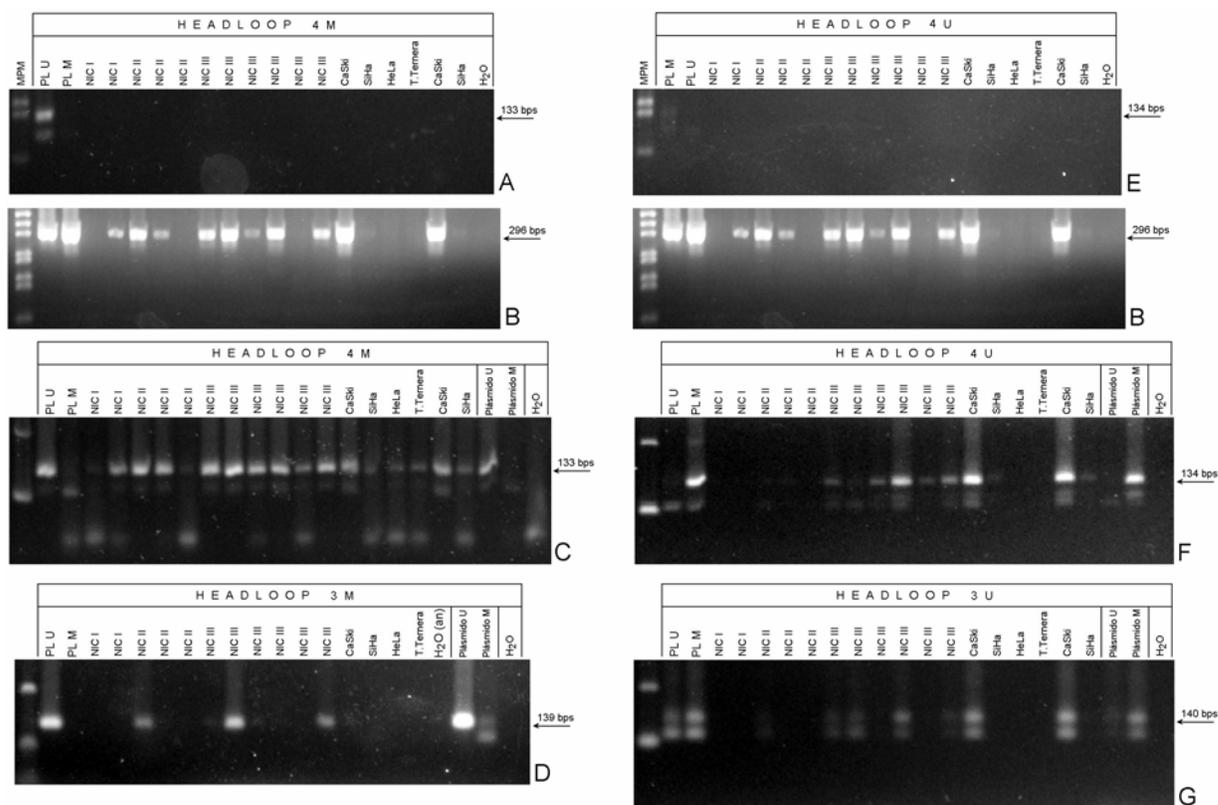


Figura 22. La metilación en los sitios CpG 5602, 5608, 5611 y 5617 incrementa conforme las lesiones evolucionan hacia cáncer cervicouterino

A y E. Reacción de Amplificación/Supresión en muestras de diferentes grados histológicos y en líneas celulares con *Headloops* 4M y 4U, respectivamente. **B.** Amplificación de la región *L2/L1* en muestras y líneas celulares. **C, D, F y G.** Reacción anidada de Amplificación/Supresión con *Headloops* 4M, 3M, 4U y 3U, respectivamente, usando como templado los productos obtenidos en **B**. MPM: marcador de pesos moleculares. H₂O: controles negativos. Las flechas indican los productos de amplificación

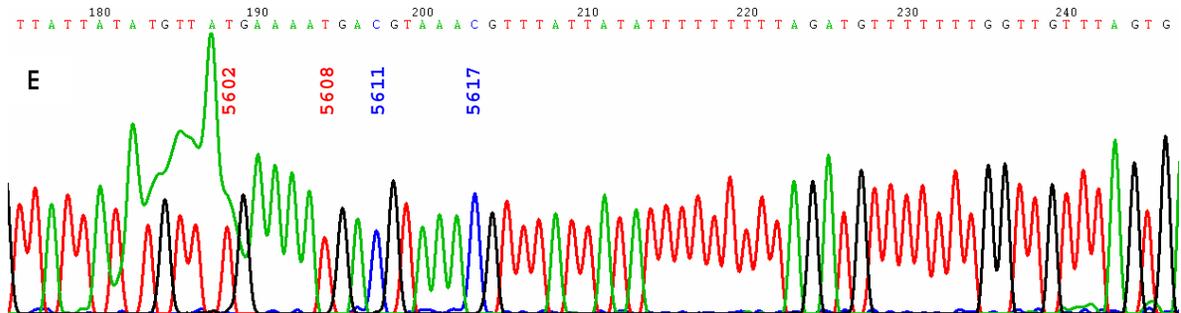
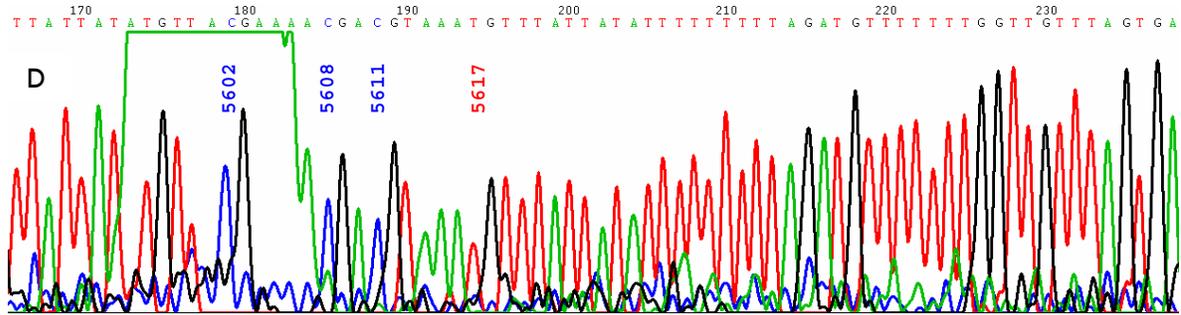
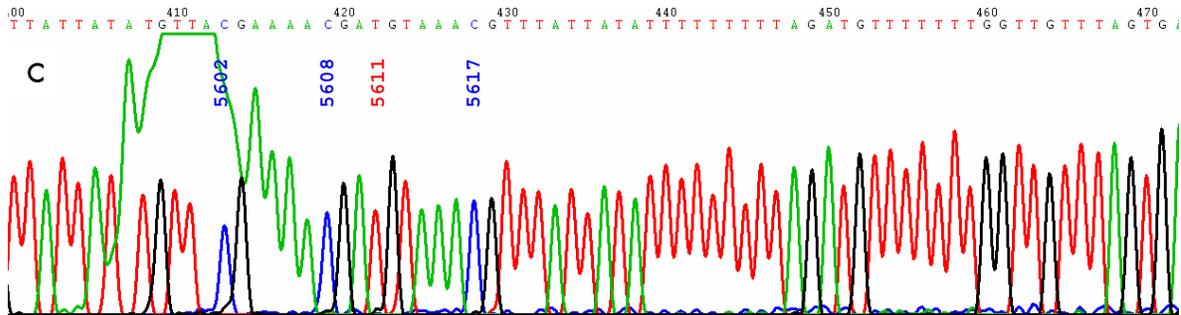
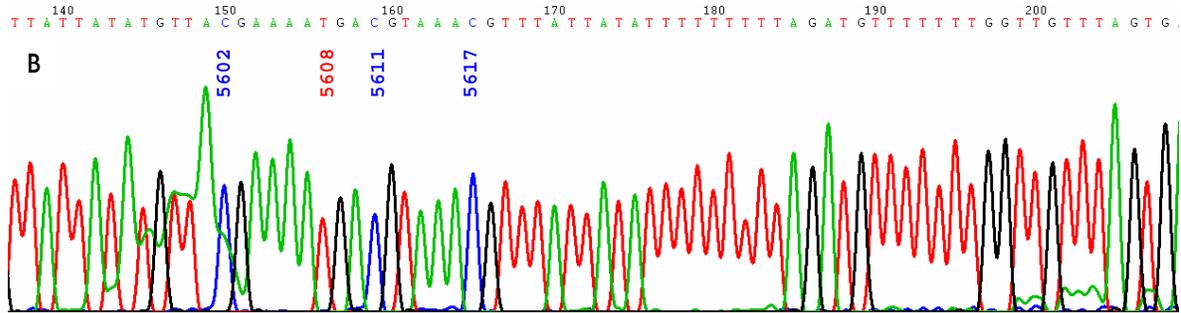
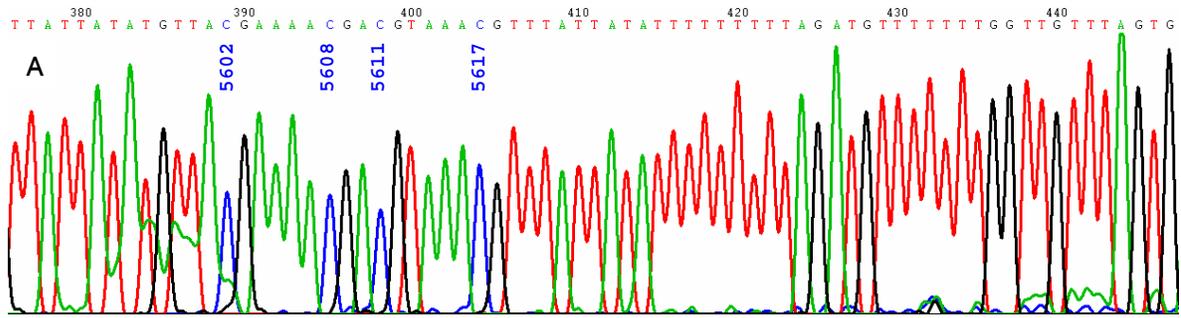


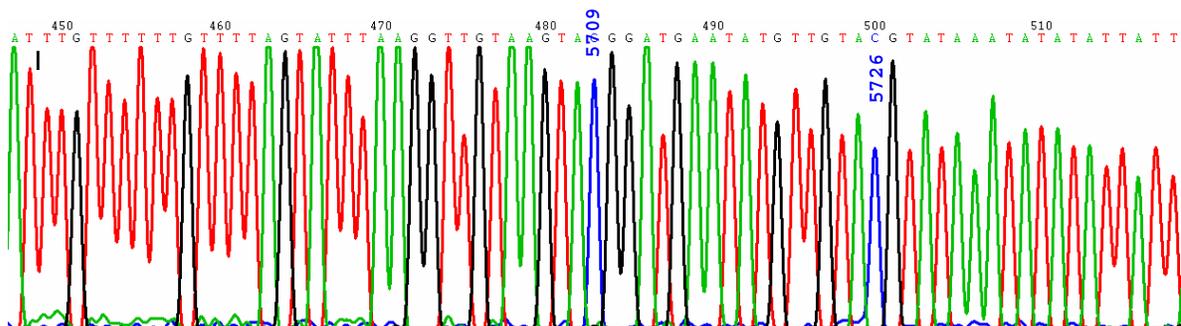
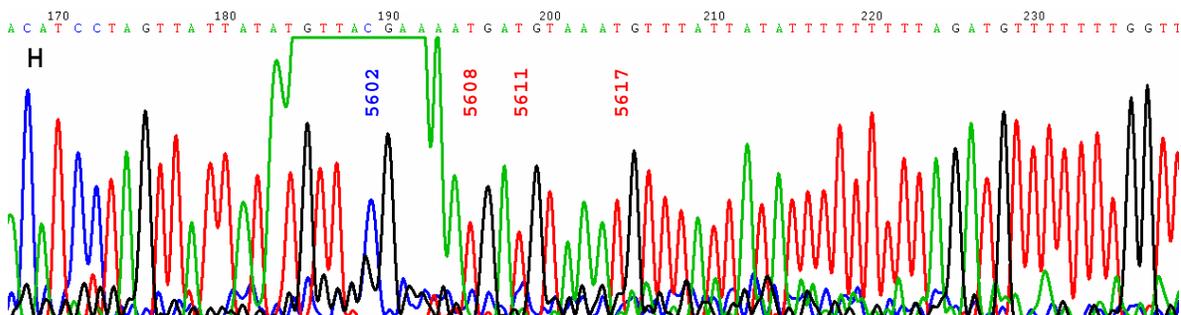
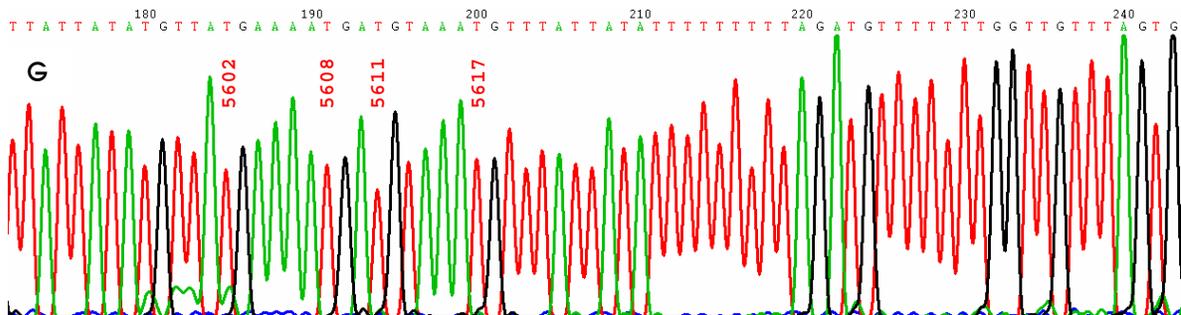
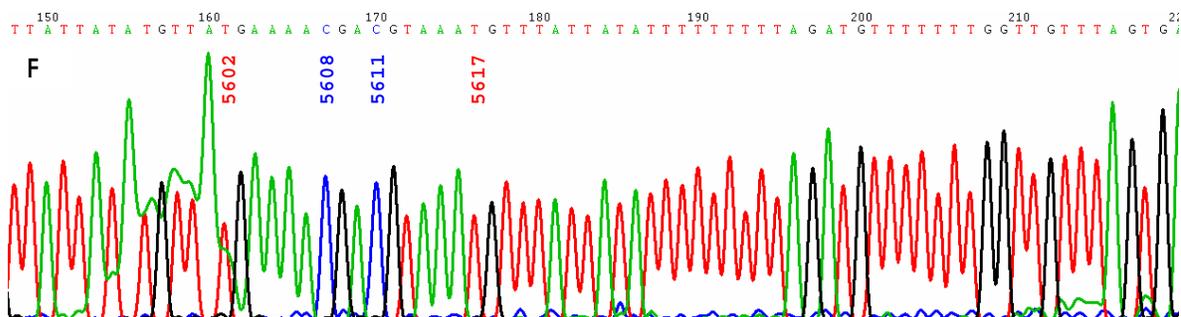
Patrones de Metilación de L2/L1 en Cáncer Bucal

Secuenciación de la Región L2/L1 de HPV 16 en Muestras de Cáncer Bucal

Como parte del proceso de estandarización de la técnica, para la obtención de los moldes se determinaron los patrones de metilación en muestras de cáncer bucal. Aunque el análisis de la metilación en estas muestras no se encuentra dentro de los objetivos originales del presente estudio, a continuación se presentan tales resultados, por aportar nuevos datos sobre los mecanismos epigenéticos asociados a la progresión de este tipo de malignidad.

Los productos obtenidos en la PCR de colonias (Figura 12) se secuenciaron (Figura 23) a fin de determinar el patrón de metilación de los dinucleótidos CpG 5602, 5608, 5611 y 5617; 5709 y 5726, en cada clon e identificar patrones relevantes (Tablas 3 y 4).





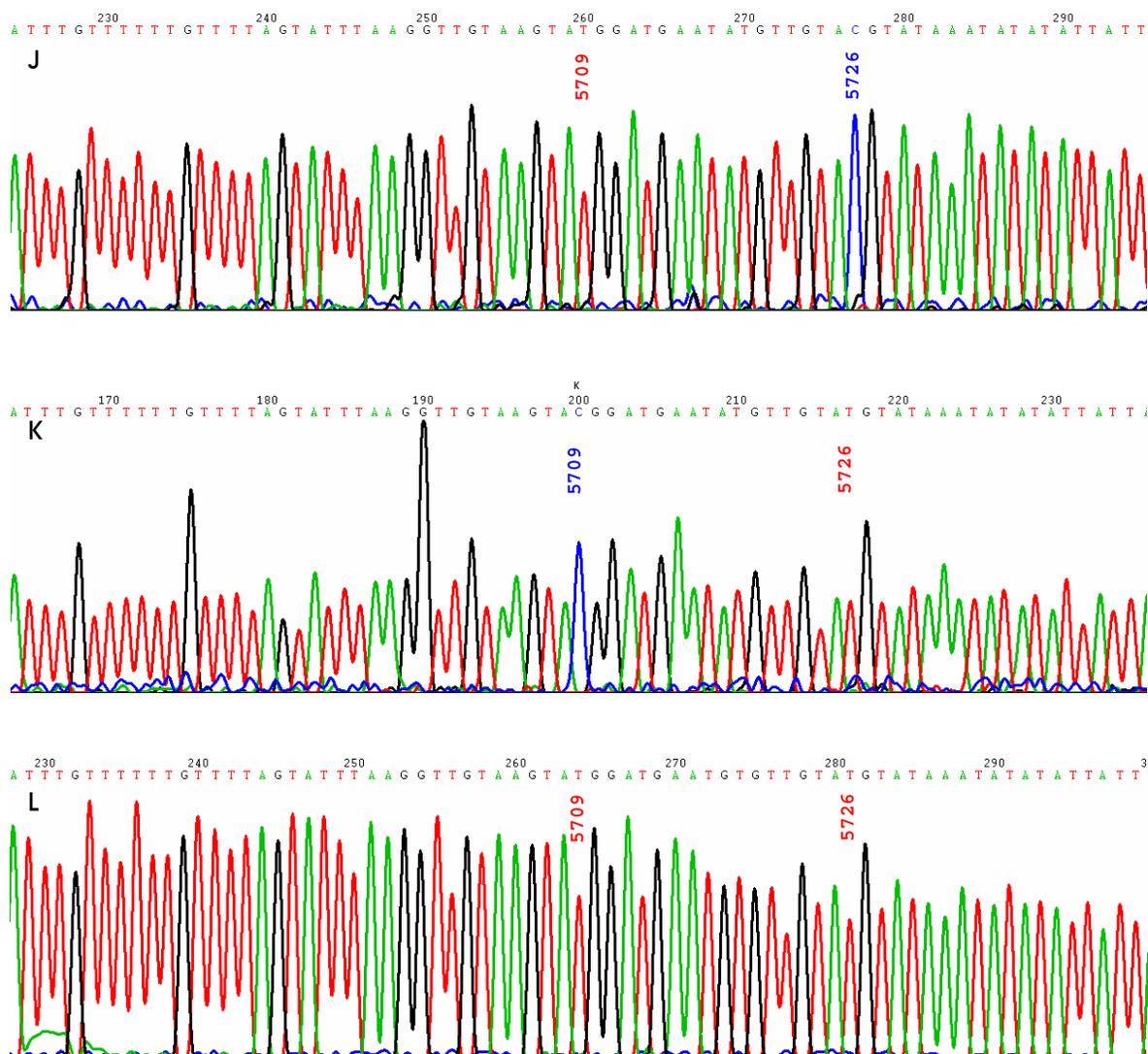


Figura 23. Electroferogramas representativos de la región L2/L1 en diferentes clones

A-G: Sitios 5602, 5608, 5611 y 5617. **A.** Cuatro sitios metilados **MMMM** (o M).

B MUMM. C MMUM. D MMMU. E UUMM. F UMMU. G UUUU (o U). **H MUUU.**

I-L: Sitios 5709 y 5726. **I MM. J UM. K MU. L UU.** Se indica la posición de

las citocinas analizadas (Sitios metilados: azul; sitios desmetilados: rojo)

La información derivada de la secuenciación de la región L2/L1 de diferentes clonas se encuentra recopilada en la Tabla 3, donde es posible observar la presencia de patrones de metilación en general homogéneos y que no guardan correlación con el estadio del cáncer del que se obtuvo la biopsia correspondiente.

Dado que la región *L2/L1* contiene seis sitios CpG, pero el análisis por *Headloops* sólo se enfoca a los primeros cuatro, en la Tabla 4 se presentan los patrones relevantes de metilación mosaico identificados mediante secuenciación, así como la clona en donde se aisló cada uno de ellos.

La secuenciación de la región *L2/L1* de estas biopsias de cáncer oral, permite observar que estos cuatro sitios CpG (5602, 5608, 5611 y 5617), más otros dos incluidos en el fragmento clonado (5708 y 5725) no obedecen a un patrón que pueda asociarse con el estadio o el grado de diferenciación. Con excepción de las biopsias 33 y 45, que presentan patrones heterogéneos, en general, los seis sitios en conjunto suelen mostrar patrones homogéneos, bien de hipermetilación, o hipometilación (Tabla 3).

Los plásmidos con patrones relevantes (Tabla 4) fueron aislados y empleados para estandarizar la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* frente a metilación mosaico.

Tabla 3. Resumen de patrones de metilación en la región L2/L1 de HPV16 en muestras de cáncer bucal

Las columnas representan los sitios CpG. Los renglones representan clones individuales. Se analizaron 10 clones de cada biopsia. Los cuadros blancos representan sitios desmetilados; los rojos, sitios metilados; y los grises, sitios o clones cuyo análisis no fue concluyente

Clasif	Clon/CpG	5602	5608	5611	5617	5709	5726
Estadio IV Moderadamente diferenciado	B8.1	U	U	U	U	U	U
	B8.2	U	U	U	U	U	U
	B8.3	U	M	M	U	U	M
	B8.4	U	U	U	U	U	U
	B8.5	U	M	M	U	U	U
	B8.6	U	M	M	U	U	U
	B8.7	U	U	U	U	U	U
	B8.8	U	U	U	U	U	U
	B8.9	U	U	U	U	U	U
	B8.10	U	U	U	U	U	U
Estadio IV Bien diferenciado	B47.1	U	U	U	U	U	U
	B47.2	U	U	U	U	U	U
	B47.3	U	U	U	U	U	U
	B47.4	U	U	U	U	U	U
	B47.5	U	U	U	U	U	U
	B47.6	U	U	U	U	U	U
	B47.7	U	U	U	U	U	U
	B47.8	U	U	U	U	U	U
	B47.9	U	U	U	U	U	U
	B47.10	U	U	U	U	U	U
Estadio III Moderadamente diferenciado	B33.1	M	U	M	M	U	M
	B33.2	U	U	M	U	M	M
	B33.3	M	U	M	M	M	M
	B33.4	M	M	U	M	M	M
	B33.5	M	M	M	M	M	M
	B33.6	M	M	M	M	U	M
	B33.7	M	U	M	M	M	M
	B33.8	M	M	U	M	M	M
	B33.9	U	U	M	M	M	U
	B33.10	M	U	M	M	M	M
Estadio III Bien diferenciado	B7.1	U	U	U	U	U	U
	B7.2	U	U	U	U	U	U
	B7.3	U	U	U	U	U	U
	B7.4	U	U	U	U	U	U
	B7.5	U	U	U	U	U	U
	B7.6	U	U	U	U	U	U
	B7.7	U	U	U	U	U	U
	B7.8	U	U	U	U	U	U
	B7.9	U	U	U	U	U	U
	B7.10	U	U	U	U	U	U
Estadio III Bien diferenciado	B28.1	M	U	U	U	M	M
	B28.2	M	U	M	U	U	M
	B28.3	U	U	U	U	U	M
	B28.4	M	M	M	M	M	M
	B28.5	M	M	M	M	M	M
	B28.6	M	M	M	M	M	M
	B28.7	M	U	M	U	M	M
	B28.8	M	M	M	M	M	M
	B28.9	M	M	M	M	M	M
	B28.10	M	M	M	U	M	M
Estadio III Bien diferenciado	B45.1	U	U	U	U	U	U
	B45.2	U	U	U	U	U	U
	B45.3	U	U	M	U	U	U
	B45.4	U	U	M	U	U	M
	B45.5	U	U	U	U	U	U
	B45.6	U	U	U	M	U	M
	B45.7	U	U	U	U	U	U
	B45.8	U	M	U	M	U	U
	B45.9	U	U	U	U	M	U
	B45.10	U	U	U	U	U	M
Estadio III Bien diferenciado	B52.1	U	U	U	U	U	U
	B52.2	U	U	U	U	U	U
	B52.3	U	U	U	U	U	U
	B52.4	U	U	M	U	U	U
	B52.5	U	U	U	U	U	U
	B52.6	U	U	U	U	U	U
	B52.7	U	U	U	U	U	U
	B52.8	U	U	U	U	U	U
	B52.9	U	U	U	U	U	U
	B52.10	U	U	U	U	U	U
Estadio I Bien diferenciado	B48.1	M	U	M	M	M	M
	B48.2	M	M	M	M	M	M
	B48.3	U	U	M	M	M	M
	B48.4	M	U	M	M	M	M
	B48.5	M	U	M	M	M	M
	B48.6	M	M	U	M	M	M
	B48.7	M	U	U	M	M	M
	B48.8	M	M	U	M	M	M
	B48.9	M	M	M	M	M	M
	B48.10	U	U	M	M	M	M

Progresión

Tabla 4. Resumen de los patrones de Metilación Mosaico identificados en clones individuales

Se muestran las combinaciones de patrones de metilación de los primeros cuatro sitios CpG. Los sitios metilados se indican con cuadros rojos y los no metilados en cuadros blancos. En la primer columna se señala la colonia portadora del patrón identificado

Clon / CpG	5602	5608	5611	5617
B28.8	M	M	M	M
B48.5	M	U	M	M
B33.8	M	M	U	M
B28.10	M	M	M	U
B28.7	M	U	M	U
B48.10	U	U	M	M
B8.6	U	M	M	U
B28.1	M	U	U	U
B45.4	U	U	M	U
B8.10	U	U	U	U



Análisis *in silico* de L2/L1 de Diversos Virus del Papiloma Humano

Los Dinucleótidos CpG en la Región L2/L1 de Diferentes HPVs Están Conservados

A fin de establecer si la presencia de estos cuatro sitios CpG, localizados inmediatamente río arriba del codón de inicio de *L1*, es una particularidad del HPV 16, o si se trata, por el contrario, de elementos conservados en buena parte de los papilomavirus, que pudieran sugerir algún papel potencial de los mismos dentro de la regulación epigenética del ciclo viral, se realizó un análisis de la región *L2/L1* de todos los HPVs reportados en la literatura (Los Alamos National Laboratory). Las secuencias fueron alineadas empleando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y organizadas por grupos filogenéticos según la clasificación de HU-Bernard (Chan *et al.*, 1995). Esta comparación permitió determinar que en esta región existen sitios CpG conservados entre los diferentes grupos virales, en ocasiones con variaciones en posición y número. No obstante hay una señal aceptora de *splicing* (AG) presente en prácticamente la totalidad de los tipos virales precediendo el codón de inicio de *L1* (Figura 24).

				5602	5608	5611	5617	3' SA /	5639	5644	L1 cod	L2 and	5651
S U P E R G R U P O A	Grupo A1	hvp32	TGGTATTAGGATGGGATTTTATATGTCATCCAG----	TTATATGTG--	GCGTAAGCGCGTAAACCTGTACCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	CGTGTGGC--	GGCCTAG				
		hvp42	TGGTATCAGGATGGGATTTTATATGTCATCCAG----	TTATATGTG--	GCGTAGGCGCGTAAACCTGTACCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	CGTGTGGC--	GGCCTAG				
	Grupo A2	hvp3	ACATAGATGGCGGGATTTTATCTATGCGCTGTACCTTC	TTTGGCCCTGTTGCGCCGACGCTGCGCGTAAAC	CGTGTCTCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	ACTGTGGC--	GCTCTAG				
		hvp10	ACATAGATGGCGGGATTTTATCTATGCGCTGTACCTTC	TTTGGCCCTGTTGCGCCGACGCTGCGCGTAAAC	CGTGTCTCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	ACTGTGGC--	GCTCTAG				
		hvp28	ACATAGATGGCGGGATTTTATCTATGCGCTGTACCTTC	TTTGGCCCTGTTGCGCCGACGCTGCGCGTAAAC	CGTGTCTCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	ACTGTGGC--	GCTCTAG				
		hvp29	ACATAGATGGCGGGATTTTATCTATGCGCTGTACCTTC	TTTGGCCCTGTTGCGCCGACGCTGCGCGTAAAC	CGTGTCTCATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	ACTGTGGC--	GCTCTAG				
	Grupo A3	hvp61	ATATTGAGGGCTTGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp72	ATTTTGGGGCTTGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	Grupo A4	hvp2a	ATATTGAGGGCTTGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp27	ATATTGAGGGCTTGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp57	ATATTGAGGGCTTGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	Grupo A5	hvp26	TTGTGATGGGGATAATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp51	TTATACATGGGGATAATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo A6	hvp30	TTATACATGGGGATAATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp53	TTATACATGGGGATAATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp56	ATATACAGGGATCTCTCTTTGATATGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp66	ATATACAGGGATCTCTCTTTGATATGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo A7	hvp18	GTATACATGGTACACATTATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp39	CAATTCAGGGTCCCAATTATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp45	TTATTCATGGGCACAAATATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp59	ATATAGAAAGGCAAAATATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp70	CAATTCAGGGTCCCAATTATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp6me180	CTATATATGGCCCAATTTATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo A8	hvp7	TGATTCGGGCTGACTGATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp40	TAATTCAGGGTCCCAATTATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp16	TTGCTGATGGGCTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp33	TTGTAGACGGGCTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp58	TTGTGGATGGTCTGATTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp52	TTGTGATGGTACAGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp35	TTGCAGATGGGGGTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp35h	TTGCAGATGGGGGTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp31	TTGTGATGGGGGTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo A9	hvp6b	TCATTACAGGTTCTGGATTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp11	TTATTCAGGGTCTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp13	TTATTCAGGGTCTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp55	TTATACAGGGTCTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo A10	hvp34	AAATGGAAACA--CTACTGGTACAAACACAAAG----	TGTTTTGCAAGTGAATTTTCACTAACCTGCAAAAT	CTCCAT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp73	ATATTTATGGGTCAAGTTTATATTTACCCCTAG----	TTATATTTGTTAAAGCGCAAAAGCGTAAACGTT	CTGTCCAT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	L P R	hvp54	TGTTAAAT--GGTGGGATTTTACCTGCATCCCTAG----	TTATATTTGTTAAAGCGCAAAAGCGTAAACGTT	CTGTCCAT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
S U P E R G R U P O B		hvp5	TGACAGTACAG--GGGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp5d	TGACAGTACAG--GGGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp5b	TGACAGTACAG--GGGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp8	TGATACATAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp9	TGATACATAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp12	TGATACATAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp14d	TGATACATAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp15	AGAGGCAGGTG--GAGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp17	AGAGGCAGGTG--GAGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp19	TGACACACAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
		hvp20	TGACACACAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	Grupo B1	hvp21	TGATACATAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp22	ACATTCCTCT--TTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp23	GGACAGTCTT--TTGATTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp24	AGATAGTAGT--GGGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp25	TGACACACAGT--GTGACTTTTATTTGTTGCTGCTG----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp36	TGACACACAGT--GTGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp37	AGAGGCAGGTG--GAGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp38	TGATTCCTCTG--GAGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp47	TGACAATTCTG--GAGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
	hvp49	AGATACCTCTG--GGGACTTTTATTTACATCCCAAGT----	TTATGTGTTTTTCTTAAACGCTGTAACCGTGTACCC	ATATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					
Grupo B2	hvp4	TATATTTAGTA--CGGATTTTGTATATCGTCTAGT----	TTATAT--	CGCAAGAAACGGAAACGATTAGAAATGTTTAA	TT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp48	TAGTTA--	CT--	CAGACTTTGCTTTAGATCCCTTT	TTTATT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp60	TGTTTA--	TG--	ATGACTTTTATTTACATCCCTAGT	CTTCTTAGGCGCCGAAACGAAACGCTGGATTTT	TTTTTAA--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG			
	hvp50	TTA--	TT--	CAGATTTAGTTTACATCCAGT	CTTCTT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp65	GTTTACAGTT--CTGACTTTGTATATCGTCTAGT----	TTGTAT--	CGCAAGAAACGGAAACGATTAGAAATGTTTAA	TT--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
Grupo E1	hvp1a	CAACTCAACG--GGGATTTGAGTTTACATCCCTAGT----	TTATAT--	TAGAAAGC--	GTGCTAAAGAGCTTATGTATAATGT	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
	hvp63	TAATTCACAG--GGGATTTAGGATTTACATCCCAAGT----	TTATAT--	CGGTAAC--	GTGCAAAATTTAGTTTATTTATGATAT	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG				
L A	hvp41	AAATGAATTCAGGAAATAGATTTATTAAGTCG----	GATGGTGAAGAAAGCAGGAGGCGGAGACTCGATTT	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG						
N C	hvp74	TTATACATGGTTCATCTTTATATATATCATC----	ATGGTATTTTGCACGCAAAAGCGTAAACGTT	CTGTCCCTG--	TTTTTCAG--	ATGTC--	TTTGTGGC--	GGCCTGG					

Figura 24. Los dinucleótidos CpG y la señal de splicing AG están conservados en la región L2/L1 de diversos HPV's

Se realizó el alineamiento de la región en estudio para 70 HPV's reportados en la literatura (HPV Sequence Database, Los Alamos National Laboratory: <http://www.stdgen.lanl.gov/>). El genoma de HPV 16 está indicado en color verde oscuro. Los números en la parte superior corresponden a las posiciones en el genoma de éste: cuadro verde, codón de inicio de L1; cuadro rojo, codón de término de L2; cuadro amarillo, aceptor de splicing 3'. LPR: Linaje pobremente resuelto; LA: Linaje aislado; NC: No clasificado (de acuerdo a Chan, *et al.*, 1995)



Discusión

“Será por otra parte más provechoso conferenciar a menudo con nuestros compañeros de clase sobre nuestros estudios comunes, pues la disputa agudiza la mente, educa la lengua, y fortalece la memoria, y no sólo nosotros aprendemos numerosas cosas mediante la disputa, sino que también entendemos mejor, expresamos más aptamente, y recordamos más firmemente las cosas que aprendemos mediante esta forma.”

PIER PAOLO VERGERIO (EL VIEJO) “SOBRE LAS COSTUMBRES NOBLES Y ESTUDIOS LIBERALES DE LA JUVENTUD”. 1402.

“Das, was man nicht erwartet hat, entdeckt man, als ob niemals eines Menschen Auge je vorher es erblickt hätte.

(Eso, que no se había esperado, se descubre, como si jamás unos ojos humanos alguna vez antes lo hubiesen divisado.)”

PETER BAMB “FRÜHE STÄTTEN DER CHRISTENHEIT”, 1955.

Amplificación/Supresión de la PCR por Headloops

Hasta donde sabemos, esta es la primera ocasión en que se emplea la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* para el estudio de la metilación de un mínimo de cuatro y tres sitios CpG, ya que Rand *et al.* (2005) reportaron la aplicación de la misma con cinco y seis bases como elementos discriminatorios.

Como primer paso se buscó determinar si la capacidad de discriminación de los *Headloops* puede ser afectada por la DNA polimerasa empleada para la PCR, ya que se conoce bien la capacidad de la *Taq* DNA polimerasa (proveniente de *Thermus aquaticus* (*T. aquaticus*)) para agregar desoxinucleótidos (más frecuentemente dATP) en el extremo 3' del producto amplificado, de manera independiente del molde (Clark, 1988; Brownstein *et al.*, 1996), conocida como actividad desoxinucleotidil terminal-transferasa (TdT) (Costa

y Weiner, 1994), la cual, podría interferir con una formación adecuada de la estructura de *Hairpin* debido a un desapareamiento inexistente entre el *Amplicón* y esta probable adición de adenina en el extremo 3' de la Cabeza. Con este fin, se evaluó la *Pfu* DNA polimerasa, una enzima de alta fidelidad proveniente de *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*), conocida por su capacidad de producir extremos romos en 3', careciendo de actividades de DNA extendasa o TdT (Costa y Weiner, 1994; Costa y Graftsky, 1994), además de mostrar mayor fidelidad comparada con la *Taq* DNA polimerasa (Cline *et al.*, 1996). Como puede verse en la Figura 13, la *Pfu* DNA polimerasa se desempeña mejor que la *Taq* DNA polimerasa, ya que en presencia de *Pfu* es posible suprimir la amplificación de la secuencia competidora, cuando la temperatura de hibridación es la óptima para el oligonucleótido *Headloop* en cuestión. Sin embargo, en presencia de *Taq* DNA polimerasa, no se observa supresión en donde se esperaría que la hubiese (es decir, *Headloop* 4M + Plásmido M; *Headloop* 4U + Plásmido U; *Headloop* 3M + Plásmido M; *Headloop* 3U + Plásmido U; etc.). En este trabajo (Figura 13) se ensayaron dos marcas comerciales de *Taq* DNA Polimerasa, y aunque se comportaron de manera diferente entre sí, ninguna de ellas alcanzó una capacidad adecuada de discriminación, demostrando que ese efecto está relacionado con la enzima, y no sólo con la marca comercial o el *Hot Start*. Dadas las especificaciones de la *Taq*, puede sugerirse que esta falta de discriminación se debe a su actividad TdT.

Asumiendo que no existe interferencia por la TdT de la *Taq*, los desapareamientos esperados serían T·G o C·A. Se ha reportado que estos desapareamientos en el extremo 3' son extendidos con una eficiencia 10^{-3} a 10^{-4} veces menor, en comparación con apareamientos correctos (Huang *et al.*, 1992), por lo que esto no debería ser especialmente importante en el contexto de apareamientos correctos del *Headloop*. No obstante, debe tenerse en cuenta que se ha demostrado que los oligonucleótidos que terminan en T son extendidos eficientemente aún cuando estén desapareados (Kwok, *et al.*, 1994).

Ahora bien, asumiendo que la TdT de la *Taq* DNA polimerasa juega algún papel, eso significaría la presencia de un doble desapareamiento falso T·G + A·C, en el caso de los *Headloops* M; y C·A + A·C en el de los *Headloops* U. La desestabilización de la estructura de *Hairpin* por este doble desapareamiento inexistente, sumada a la reducida capacidad de extensión de la *Taq* para un desapareamiento A·C (Huang *et al.*, 1992), favorecería la amplificación de la secuencia.

Por el contrario, si existe un apareamiento perfecto (por lo que se esperaría la supresión de la amplificación) esta base extra en el extremo 3' produciría, en la mayoría de los casos, un desapareamiento falso A·C, muy refractario a la extensión, con la consecuente desestabilización del *Hairpin* y una amplificación falsa positiva, lo que podría explicar la incapacidad de todos los *Headloops* evaluados para discriminar entre ambas secuencias, cuando son sometidos a PCR con *Taq* DNA Polimerasa.

La capacidad de discriminación se pierde completamente con los *Headloops* que sólo tienen un sitio discriminatorio (1M y 1U), independientemente de la Tm (Figura 14), sugiriendo que su ineficacia radica en la incapacidad de la Cabeza para estabilizar eficientemente la estructura de *Hairpin* que debería suprimir la subsecuente amplificación. En concordancia con esto, los *Headloops* con dos sitios discriminatorios (2M y 2U) muestran una menor capacidad en relación a los *Headloops* de tres y cuatro sitios, pero es aún ligeramente superior a la de los *Headloops* con uno solo. Dado que la *Pfu* DNA polimerasa posee actividad de exonucleasa 3' a 5', y que la única base discriminadora en los oligonucleótidos de un sitio (1M y 1U) está localizada en el extremo 3', es muy probable que esta falta absoluta de discriminación pueda deberse a la capacidad de corrección de lectura de la *Pfu* sobre la base desapareada.

Rand *et al.* (2005) encontraron que el desempeño de los *Headloops* es altamente dependiente de la Tm y de la concentración de iones Mg²⁺, y que concentraciones bajas de los anteriores (0.3 mM) son especialmente críticas y redundan en la máxima selectividad. No obstante lo anterior, las curvas de MgSO₄ obtenidas en el presente

estudio (Figura 15) revelan que a bajas concentraciones de este ion no se presenta siquiera la amplificación, y que la Amplificación/Supresión óptimas se obtienen con una concentración de iones libres de Mg^{2+} de 2 mM, con todos los oligonucleótidos *Headloop* ensayados. Dado que este diseño de *Headloops* se comporta de manera diferente a lo reportado por Rand *et al.* (2005), puede sugerirse que cada diseño de estos oligonucleótidos tiene parámetros particulares en cuanto a sus condiciones óptimas de reacción, haciendo difícil extraer conclusiones aplicables a todos los *Headloops*.

Los resultados obtenidos frente a la metilación mosaico (Figura 21) apoyan también la noción de que el umbral de sensibilidad del presente diseño es de tres bases discriminadoras. De manera independiente del patrón de metilación presente en los diferentes moldes, los *Headloops* de un sitio carecen por completo de capacidad discriminadora, dando origen tanto al producto de PCR como a la estructura de *Hairpin*. En el caso de los *Headloops* de dos sitios, se observó un incremento moderado en la intensidad de las bandas en aquellas reacciones donde se esperaría Amplificación, en comparación con aquellas en donde se esperaría que dominase la Supresión, sin embargo, tal como ocurre con los *Headloops* 1M y 1U, en todas las reacciones se observa la presencia de producto de PCR y *Hairpin*. Una interesante tendencia observada con el *Headloop* 4M es que, una citosina desmetilada localizada en la posición dos de cuatro, tiene un fuerte efecto desestabilizador sobre la estructura del *Hairpin*, dando lugar al producto de PCR. De hecho, al comparar el desempeño del *Headloop* 4M con aquél del 3M, frente al molde MUMM, el último muestra un mayor efecto supresor que el primero, indicando que el efecto desestabilizador de cada desapareamiento es altamente dependiente del contexto, dado que en el caso del 3M, el desapareamiento se encuentra más cerca del extremo 3' y por tanto se esperaría que éste tuviese un efecto desestabilizador más grande, cuando, esto, de hecho, no es el caso.

En relación con el *Headloop* 4U, los resultados obtenidos sugieren que una buena discriminación depende de la presencia de al menos dos desapareamientos adyacentes

(MM), dado que en la presencia del molde MUMU, ambos, el producto de PCR y el *Hairpin* se producen en cantidades más o menos equivalentes. Desafortunadamente, esto también es cierto para el *Headloop* 3U, aún frente a MMMM y UUUU, sugiriendo que, aunque el *Headloop* 3M aún retiene alguna capacidad discriminadora, el *Headloop* 3U, prácticamente la ha perdido por completo. Aunque el estudio de los patrones de metilación podría sugerir que la metilación mosaico en este grupo de CpGs no es muy común, al menos en las muestras de cáncer bucal estudiadas durante la estandarización de la técnica (ver Tabla 3), sería deseable realizar futuros estudios del papel que ésta juega en el desempeño de los *Headloops*, en tanto se define cuán común o poco común es la metilación mosaico en los diferentes tipos de cáncer donde HPV 16 está implicado, así como en la diversas etapas de evolución de los mismos.

En este trabajo se observó de manera constante que la presencia de dos bandas es muy común, una en el rango de 133 a 145 bps, que corresponde al producto de PCR, y otra más pequeña en el rango de 103 a 116 bps, que corresponde a la estructura de *Hairpin* (secuencia suprimida). Esto es especialmente claro en las Figuras 20A y 20B, donde puede verse cómo, conforme la concentración de la secuencia competidora incrementa, la intensidad de la banda en 103/104 bps aumenta en forma proporcional. Parece haber una tendencia a la formación de esta estructura, aún cuando sólo hay secuencia blanco, y de forma inversa, a la formación de cierta cantidad de producto de PCR aún cuando sólo existe secuencia competidora, por lo que esto debe ser tenido en cuenta al diseñar una prueba diagnóstica, donde siempre deberán ser incluidos controles de amplificación y supresión. El mejor acercamiento para superar este problema sería la incorporación de un ensayo de PCR en tiempo real, que debería basarse en el uso de sondas *Taqman* dirigidas específicamente a detectar el producto de PCR. El adecuado diseño de tal estrategia seguramente incrementaría tanto la sensibilidad como la especificidad de esta técnica, incluso mucho más allá de la alcanzada por el presente acercamiento en tiempo final, siendo posible alcanzar resultados comparables a los reportados por Rand *et al.*

(2005), donde se emplearon sondas separadas para la detección de secuencias metiladas y desmetiladas. Otro problema que debe solucionarse es el límite de detección de esta técnica, dado que, como puede apreciarse en la Figura 19, la sensibilidad de los *Headloops* se reduce por la presencia de DNA distinto (ya sea genómico o plasmídico) de las secuencias blanco, lo que seguramente sería el caso en una aplicación clínica de esta técnica, donde se desearía detectar incluso unas pocas copias de un gen particular (de HPV 16 en este caso) en el contexto de DNA genómico de una población celular heterogénea. Aunque con un efecto menor, Rand *et al.* (2005) parecen haber encontrado también una reducción en la sensibilidad y selectividad cuando evaluaron los *Headloops* con DNA de fondo, ya que ellos reportan la detección de su secuencia blanco hasta 1 en 10^5 cuando amplificaron DNA plasmídico, contra 1:4000 (1 en 4×10^3) en presencia de DNA genómico.

Finalmente, los *Headloops* de cuatro y tres sitios fueron empleados para estudiar la metilación en biopsias y líneas celulares. En la Figura 22A y 22E se observa que la aplicación directa de los *Headloops* 4M y 4U al DNA modificado no genera señal detectable. En principio esto es de esperarse, ya que la conversión con bisulfito tiene como consecuencia una importante degradación del DNA, lo que normalmente resulta en decrementos en la sensibilidad de las técnicas de PCR realizadas sobre este DNA, en relación con una PCR realizada con DNA no tratado (Frommer *et al.*, 1992), lo que en el contexto de los *Headloops* parece tener especial importancia, dada la disminución en la sensibilidad en presencia de DNA genómico. En un ensayo en tiempo final este problema puede superarse realizando la técnica de Amplificación/Supresión en una PCR anidada, tal como se muestra en la Figura 22, donde se obtuvieron señales detectables al emplear como templado el producto de amplificación de los oligonucleótidos L2L1F y L2L1F.

Así, el actual diseño de los *Headloops*, es adecuado para estudiar cuatro, y con algunas reservas, tres sitios CpG. No obstante, su potencial aplicación en un ámbito clínico como biomarcador de progresión, deberá tomar en cuenta lo siguiente: primero, la enzima

usada debe ser alguna que produzca extremos romos (como la *Pfu* DNA polimerasa), ya que la actividad TdT característica de algunas DNA polimerasas parece interferir de forma muy importante con la adecuada discriminación de los *Headloops*. Segundo, la capacidad de discriminación del actual diseño es óptima para detectar cuatro sitios metilados o desmetilados al mismo tiempo (y es probable que un mayor número de sitios mejorase aún el análisis, tal como reportan Rand y cols.), pero el papel exacto de la metilación mosaico en el desempeño de los *Headloops* aún debe ser establecido por completo, ya que su efecto sobre la estabilidad del *Hairpin* es altamente dependiente del contexto, con el número y posiciones de desapareamientos jugando un papel crítico en ella. Tercero, aunque la presencia de DNA distinto a la secuencia blanco reduce importantemente la sensibilidad del presente diseño, un acercamiento de PCR anidado tiene la capacidad de solucionar este problema; adicionalmente, la inclusión de sondas *Taqman* para un ensayo en tiempo real tiene el potencial de incrementar significativamente la sensibilidad y la especificidad de los oligonucléotidos *Headloop*.

Hasta el momento no ha sido posible extender al análisis con *Headloops* hasta dos sitios y un sitio CpG, independientemente de los parámetros ajustados. El que esto pueda ser solucionado mediante un diseño ligeramente distinto del *Headloop*, hace que esta metodología permanezca como una interesante posibilidad que merece ser explorada.



Patrones de Metilación en la Región L2/L1 de HPV 16 en Muestras de Cáncer Oral

Para la estandarización de la técnica se emplearon plásmidos en los que se clonó la región L2/L1 de HPV 16, derivada de muestras de cáncer oral, anteriormente empleadas para analizar la metilación de la LCR y región 3' de L1 (Balderas-Loeza *et al.*, 2007), en virtud de que los HPVs de alto riesgo se han encontrado en 43.5% de casos de cáncer oral, asociándose con una proporción de momios seis veces mayor de riesgo de cancer oral, donde el tipo más frecuentemente detectado (55.6%) fue el HPV 16 (Anaya-Saavedra *et al.*, 2008). En el proceso de buscar patrones de metilación mosaico útiles para el análisis por *Headloops*, se generó la información recopilada en las Tablas 3 y 4. En la Tabla 3 puede observarse que los patrones de metilación en los seis sitios CpG incluidos en la región clonada no guardan una correlación con el estadio de la enfermedad, ya que se observan patrones homogéneos de hipermetilación en una biopsia de estadio clínico I, y grado histológico bien diferenciado (Biopsia 48), así como en dos de estadio III, bien diferenciada y moderadamente diferenciada (Biopsias 28 y 33), mientras que se detectaron patrones más bien homogéneos de hipometilación en otras biopsias estadio III, bien diferenciadas (Biopsias 7 y 52), así como en dos de estadio IV, bien diferenciada y moderadamente diferenciada (Biopsias 47 y 8, respectivamente), con un patrón heterogéneo en una biopsia de estadio III, bien diferenciada (Biopsia 45).

Los estudios de Bransma *et al.* (2009) y de Fernandez *et al.* (2009), así como el presente (Figura 24), han encontrado un incremento paralelo entre la metilación de esta región y la progresión hacia cáncer cervicouterino, por lo que, *a priori* se esperaría que en cáncer bucal esta región estuviese, de igual manera, preferencialmente desmetilada en estadios tempranos y bien diferenciados, con un incremento en la metilación conforme aumenta el estadio y la desdiferenciación. De hecho, un análisis previo realizado en nuestro laboratorio, de la LCR y región 3' de L1 de estas mismas muestras (Balderas-Loeza *et al.*, 2007) reveló cambios epigenéticos similares a los observados en carcinomas

anogenitales, por lo que en dicho reporte, a partir de estos datos, se sugiere que el cáncer bucal sigue un proceso carcinogénico análogo al cervicouterino. No obstante, el hecho de que los patrones de metilación en la región tardía en estas muestras de cáncer oral no sean similares a los reportados para el cáncer cervicouterino (ver más adelante), sugiere, de hecho, que las alteraciones epigenéticas asociadas a unas y otras lesiones son diferentes entre sí. La confirmación de este hecho requerirá del análisis de un mayor número de muestras de ambos tipos de cáncer, así como de sus estadios previos.



Región L2/L1: Epigenética y Splicing Alternativo, Ciclo Viral y Carcinogénesis

Se evaluó la aplicación de la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* para amplificar selectivamente dinucleótidos CpG metilados o desmetilados, en la región L2/L1 del HPV 16. En esta región se encuentran cuatro dinucleótidos CpG cuya importancia exacta en el ciclo viral aún debe ser establecida, aunque de acuerdo con reportes anteriores (Turan *et al.*, 2006) se ha sugerido que la metilación de sitios CpG en el gen L1 de HPV 18 incrementa conforme las lesiones progresan de bajo grado a alto grado y a cáncer. Por lo tanto, existe la posibilidad de que los sitios estudiados puedan ser empleados como un biomarcador de progresión en el caso del HPV 16.

Como puede apreciarse en la Figura 24, los dinucleótidos CpG estudiados en HPV 16, aunque no siempre en las mismas posiciones ni número de sitios, están muy conservados entre los papilomavirus, sugiriendo que la metilación de éstos podría jugar algún papel importante dentro del ciclo viral.

En el caso de HPV 16, los CpG estudiados guardan cierta similitud con sitios de unión E2, los cuales también son blanco de metilación (Figura 25), y en principio podría pensarse que se trata de sitios E2 degenerados. No obstante, hasta el momento no se ha comprobado si E2 tiene la capacidad de unirse a éstos sitios en particular, posibilidad que queda abierta y cuestión que podría solventarse empleando ensayos de EMSA.

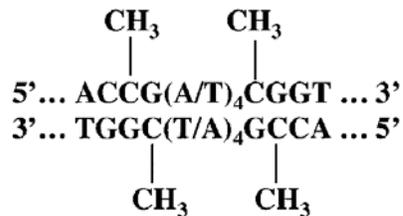


Figura 25. Sitio consenso de unión E2

Se muestran los sitios CpG susceptibles a metilación (tomado de Kim *et al.*, 2003)

De forma aún más interesante, estos cuatro sitios se encuentran unas pocas bases río arriba de una señal de *splicing* (nt. 5639) y del codón de inicio del marco abierto de lectura de L1 (nt. 5641) (Figura 26).

```

                    5641
                    5639
                    5602 5608 5611 5617
ttacatgttaCGaaaaCGaCGtaaaCGtttaccatattttttttcAGATGtctcttttggtgccTAGtga
                    -> L1 cds
                    <- L2 end
3' splice junction /\

```

Figura 26. Región L2/L1 con anotaciones

Los sitios CpG estudiados se señalan con letras rojas. El cuadro amarillo señala el sitio aceptor de splicing (nt. 5639); el cuadro verde el codón de inicio de *L1* (5641) y el cuadro rojo el codón de paro de *L2* (5658)

En la Figura 24 se aprecia que el aceptor de *splicing* AG se encuentra conservado en prácticamente todos los papilomavirus, precediendo al codón de inicio de *L1*, lo que podría revelar la función de los sitios CpG localizados río arriba de estos elementos genéticos, como posibles reguladores del *splicing*. Si bien no siempre se hallan en igual número o en una posición similar, en comparación con HPV 16, es un hecho que consistentemente se encuentran presentes río arriba de dicha señal de *splicing*.

Todos los transcritos de los papilomavirus son policistrónicos. Un pre-mRNA tardío verdadero es un transcrito quimérico de regiones tempranas y tardías, con la región temprana en su parte 5' y la tardía en 3' (Figura 27). Estos transcritos son detectables sólo en queratinocitos diferenciados (Zheng, 2006). De hecho, las proteínas *L1* y *L2* sólo son expresadas en los últimos (Zhao, 2008), y su expresión está sujeta a regulación transcripcional y postranscripcional (Hindmarsh *et al.*, 2007).

Los genes *L1* y *L2* están localizados en la región tardía del genoma viral, que se encuentra río abajo de la temprana, y bajo el control del promotor tardío P670, cuya actividad sólo es inducida en queratinocitos diferenciados. Ya que P670 está localizado en la región codificante del oncogen *E7*, la transcripción a partir de éste requiere que la señal de poliadenilación temprana sea obviada (Zheng, 2006), de manera que tanto la poliadenilación temprana como la tardía son usadas en la fase tardía, productiva, de la infección. La poliadenilación temprana es un requisito absoluto para la expresión de los genes tempranos en las primeras etapas de la infección, y es, por tanto, un regulador clave del interruptor de la fase temprana a la tardía, caracterizada por la producción de las

proteínas de la cápside. Experimentos de mutagénesis sugieren que las secuencias necesarias para la utilización de la señal de poliadenilación temprana se encuentran dentro de los últimos 100 residuos 3' de L2, ya que al ser reemplazados, se obtienen niveles elevados de mRNAs tardíos, revelando un cambio de expresión temprana a tardía. Adicionalmente, se ha observado que en esta misma región se localizan elementos necesarios para el *splicing* de mRNAs tardíos, aunque estas dos funciones parecen ser independientes entre sí. De hecho, el *splicing* desde el donador en E4 hasta el aceptor en L2 (nt. 5639) y la poliadenilación temprana son eventos mutuamente exclusivos (Öberg, 2005). Es interesante notar que los cuatro sitios CpG estudiados se encuentran en esta región 3' de L2.

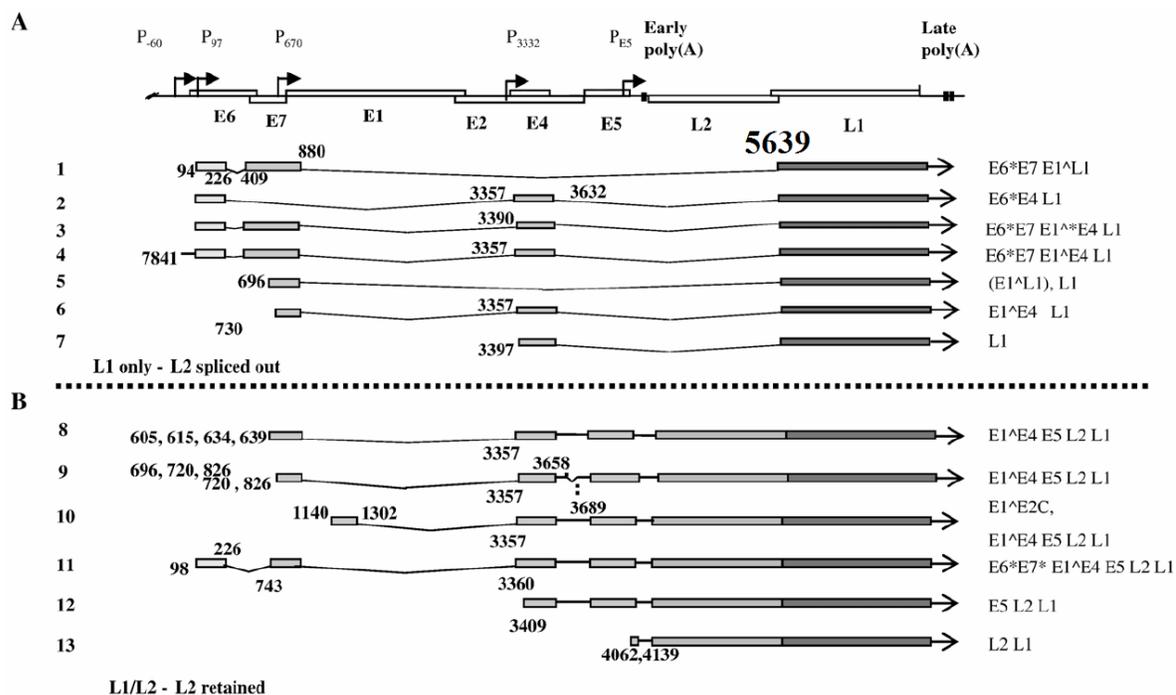


Figura 27. Diagrama esquemático de transcritos tardíos de HPV 16 identificados en células W12

A. Diagrama del genoma viral linealizado. Rectángulos blancos: regiones codificantes. Flechas: posición de promotores. *Early poly(A)* y barra vertical: sitio de poliadenilación temprana. *Late poly(A)* y barras verticales: sitios de poliadenilación tardía. **B.** Estructuras identificadas de cDNAs. Rectángulos grises: secuencias codificantes. Líneas: intrones eliminados por *splicing*. Los números indican las posiciones genómicas de los extremos 5' de los cDNAs y los sitios donadores y aceptores del *splicing* (adaptado de Milligan *et al.*, 2007)

La mayoría de los intrones son subóptimos (carecen de secuencias consenso en sus sitios de *splicing*), por lo que el *splicing* del pre-mRNA depende de potenciadores y silenciadores, en adición a las señales convencionales de *splicing* (Zheng, 2006). Existen experimentos que sugieren que conforme las células infectadas se diferencian, disminuye la producción de proteínas implicadas en este control postranscripcional, de tal suerte que la poliadenilación temprana se hace menos eficiente y se da la lectura hacia la región tardía, dando lugar a la producción de los mRNA tardíos. La producción de la proteína L1 requiere del *splicing* de estos mRNAs, proceso regulado por un silenciador del *splicing* dependiente de hnRNP-A1 (partícula de ribonucleoproteína heterogénea nuclear A1), localizado en la región codificante de *L1* y que es muy activo durante las etapas tempranas del ciclo viral para prevenir una producción prematura de *L1* por un *splicing* directo desde la región temprana (Öberg, 2005). Las secuencias regulatorias en cuestión se encuentran en el extremo 5' de *L1*, y mediante la unión de hnRNP-A1 funcionan como silenciadores del *splicing*, para suprimir el empleo del aceptor en 5639 (Cheunim *et al.*, 2008; Somberg *et al.*, 2008).

Los transcritos tardíos más abundantes corresponden al que contiene las secuencias de E1^{E4}, E5, L2 y L1; y al que codifica a los ORFs E1^{E4} y L1 (Frattini *et al.*, 1997) (transcritos 6 y 8 en la Figura 28). Los sitios de *splicing* 3632 (donador) y 5639 (aceptor) son empleados exclusivamente por los mRNAs tardíos, de hecho, los mRNAs a partir de los cuales se expresa *L1*, emplean el aceptor en 5639 (Somberg *et al.*, 2009).

Esta noción abre una interesante posibilidad. La presencia de sitios CpG conservados cerca de un aceptor de *splicing* que resulta crítico para el ciclo viral, así como la abundante evidencia que apoya la regulación epigenética de los HPVs, podrían sugerir un nuevo nivel de regulación de la expresión génica, en donde la metilación del DNA tal vez participe, también, en el control de eventos de *splicing*.

La metilación del DNA se asocia con supresión de la actividad transcripcional, mediada por la unión de proteínas que reconocen meCpGs, como MeCP2, la cual se asocia *in vivo*

con otros moduladores transcripcionales capaces de modificar la estructura de la cromatina. MeCP2 puede actuar como ancla en el DNA metilado para atraer proteínas accesorias (Nguyen, 2001), por ejemplo, reclutando HDACs al DNA metilado, actuando así como un regulador de amplio rango de genes metilados (Thatcher y LaSalle, 2006; Baylin y Herman, 2000). De hecho, se ha sugerido que MeCP2 actúa como un transmisor de la información epigenética al unirse a dinucleótidos CpG metilados simétricamente (Nikitina *et al.*, 2007). Es interesante notar que MeCP2 puede unirse a meCpGs independientemente de si éstos se encuentran en un promotor o en un exón (Nguyen, 2001), y que puede unirse incluso a un solo sitio metilado, en comparación con MeCP1, que requiere varios sitios metilados para su unión al DNA (Verma, 2006).

Entre las proteínas a las que se puede unir MeCP2, se ha identificado a YB-1 (Y box-binding protein 1), que es una de las proteínas de unión a ácidos nucleicos más conservadas. El complejo MeCP2-YB1 parece requerir de la presencia de RNA para su formación o estabilización y ser independiente de la unión de MeCP2 a DNA metilado. De hecho, la función del complejo MeCP2-YB1 parece ser la coordinación del *splicing* alternativo con la transcripción (Young *et al.*, 2005) y existe amplia evidencia de que el *splicing* y la transcripción están conectados íntimamente. Por ejemplo, muchos pre-mRNAs sufren *splicing* antes de que la transcripción llegue a su fin, lo que sugiere que en este *splicing* cotranscripcional, el *spliceosoma* está físicamente asociado con la maquinaria de síntesis de RNA (Nilsen, 2003). La evidencia experimental sugiere que el complejo de transcripción de la RNA polimerasa II posee una característica estructural que actúa específicamente para reclutar actividades de procesamiento de RNA al transcrito nascente, al ser generado en el proceso de elongación (Proudfoot *et al.*, 2002).

En un análisis proteómico reciente se identificó la presencia de al menos 305 polipéptidos involucrados en el procesamiento del pre-mRNA en *supraspliceosomas* aislados de células HeLa, entre los cuales se identificó a YB1 (Chen *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha demostrado que existe una interacción funcional entre YB1 y PP2C γ , la única fosfatasa asociada con *spliceosomas* purificados, donde YB1 actúa como cofactor de la última (Allemand *et al.*, 2007). De hecho, desde el 2001 se identificó a YB1 como una proteína capaz de unirse a elementos potenciadores del *splicing* ricos en A/C estimulando el *splicing* alternativo. Resulta interesante que una forma mutante de YB1 que contiene el dominio de unión a RNA pero carece del extremo C-terminal tiene una capacidad mucho menor para estimular el *splicing* alternativo (de *CD44*), sugiriendo que esta región juega un posible papel en el ensamblaje del *spliceosoma* temprano, y que es independiente de la unión de YB1 al RNA (Stickeler *et al.*, 2001). Esto tiene especial importancia porque la regulación de los pre-mRNAs que sufren *splicing* alternativo se logra modulando la asociación de componentes del *spliceosoma* durante las fases tempranas de formación del mismo, ya que es aquí donde los contactos entre las snRNA/proteínas y el pre-mRNA juegan un papel crucial en el reconocimiento y selección de sitios de *splicing*, y YB1 se encuentra presente en esta etapa (Hartmut *et al.*, 2002).

Ahora bien, se ha demostrado que la interacción entre YB1 y PP2C γ está involucrada en la regulación del *splicing* alternativo de *CD44* (la inclusión de los exones variables), sugiriendo que PP2C γ es también uno de los factores involucrados en el ensamblaje del *spliceosoma* temprano. Adicionalmente, se encontró que PP2C γ está fosforilada *in vivo*, por lo que es posible que la actividad del complejo YB1-PP2C γ esté regulada por la fosforilación ciclo-específica de la primera, lo que a su vez podría modular eventos específicos de *splicing* alternativo (Allemand *et al.*, 2007). Esto es especialmente interesante, considerando que la expresión de las proteínas tardías de HPV es fuertemente dependiente del ciclo celular. De hecho, la expresión de éstas se da en respuesta a la diferenciación celular (Cumming *et al.*, 2008).

A partir de estos datos surge una idea interesante, a saber, que el grado de metilación de uno o varios de los cuatro sitios CpG río arriba del aceptor en 5639 determine la unión de

MeCP2, la que a su vez reclute al *spliceosoma* temprano hacia este sitio, mediante su interacción con YB1- PP2C γ , y en coordinación con los demás elementos potenciadores y silenciadores del *splicing* presentes en L2 y L1. Otros factores dependientes del ciclo celular, como la fosforilación de YB1- PP2C γ podrían entonces participar en las decisiones de *splicing* alternativo que darán lugar a transcritos tardíos L2, L2/L1 o L1, dependiendo de los aceptores empleados.

Ahora bien, la metilación de los sitios CpG en cuestión podría estar, a su vez, finamente regulada mediante la acción de E7 sobre la DNMT1 (ver más adelante). Es interesante el hecho de que eventos epigenéticos puedan estar conectados no sólo con el inicio de la transcripción, sino también con el *splicing* alternativo. Apoyando tal sugerencia, se ha demostrado que éste también puede ser regulado por factores de transcripción reclutados a los promotores, por ejemplo, miembros del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (en particular, la ATPasa dependiente de DNA, Brahma) pueden favorecer la inclusión de exones alternativos facilitando el reclutamiento del *spliceosoma* a los sitios de *splicing* de tales exones (Batsché *et al.*, 2006). Resulta interesante que Brahma, junto con otras proteínas remodeladoras de la cromatina, ha sido identificada entre los polipéptidos presentes en los *prespliceosomas* (Chen *et al.*, 2007). Más aún, se ha descrito la asociación entre MeCP2 y Brahma (Harikrishnan *et al.*, 2005; Wade, 2005). La participación de MeCP2 en diversos procesos celulares, incluida la represión transcripcional y la regulación del *splicing*, así como sus características funcionales diversas, proporcionan la base para entender su multifuncionalidad (Adams *et al.*, 2007).

Actualmente se sabe que alrededor de 90% de los genes humanos codifican al menos dos isoformas, lo que implica que existe una amplia red de reguladores del *splicing* a fin de controlar todos estos eventos de *splicing* alternativo (Graveley, 2009), el cual también se ve afectado en los procesos oncogénicos (Venables *et al.*, 2009). Resulta atractiva la idea de que procesos epigenéticos puedan estar también involucrados en tal regulación,

aunque la confirmación de tal posibilidad requerirá de futuros experimentos que demuestren su existencia y los mecanismos involucrados.

De ser cierta esta fina regulación que vincula la metilación del DNA con el *splicing*, también puede darse una explicación plausible a la falta de expresión de las proteínas tardías del HPV en el cáncer y en líneas celulares (zur Hausen, 2002).

Se cuenta con la evidencia de metilación aberrante en el cáncer cervicouterino, donde se ha encontrado una tendencia hacia la hipermetilación de genes celulares conforme aumentan los cambios patológicos (Widschwendter *et al.*, 2004), incluidos numerosos supresores de tumores (Dueñas-González *et al.*, 2005). Por otro lado, la oncoproteína viral E7 posee diversas actividades transformadoras. Las mejor estudiadas incluyen su interacción con RB, la cual comparte con los oncogenes virales E1A de los adenovirus, y el antígeno T de SV40 (Helt y Galloway, 2003; Levine, 2009), que promueve la degradación del último y la liberación del factor de transcripción E2F, así como el incremento de INK4A. Se sabe también que E7 estimula a los genes de la fase S del ciclo celular, ciclina A y ciclina E; y que, mediante la amplificación del centriolo, induce aneuploidía en la células donde se expresa (zur Hausen, 2002). De manera relevante, se ha demostrado que E7 participa en procesos de reprogramación epigenética, ya que se le ha encontrado asociada con proteínas del grupo *Polycomb*, que forman complejos que actúan como represores transcripcionales. E7 también interacciona con desacetilasas de histonas (HDACs) y acetiltransferasas de histonas (McLaughlin-Drubin y Münger, 2009), y de forma interesante, Burgers *et al.* (2006) demostraron que E7 (y también E1A) tiene la capacidad de unirse a la DNMT1 e incrementar su actividad enzimática de metiltransferasa. Esta interacción está mediada por la región CR3 de E7, que contiene motivos de dedos de zinc y que contribuye a sus funciones transformadoras. Estos dominios tipo dedos de zinc en la región C-terminal de E7 se encuentran altamente conservados y participan también en la unión de E7 a HDACs, contribuyen a la estabilidad de la proteína y a su dimerización. Adicionalmente, son esenciales para el mantenimiento

estable del genoma viral en forma episomal y para la replicación del mismo. Es interesante el hecho de que los genomas virales deben ser mantenidos como episomas a fin de inducir las funciones tardías al diferenciarse las células hospederas. De hecho, genomas de HPV 31 con mutaciones en estos dominios de E7, muestran una disminución significativa en la producción de transcritos tardíos (Longworth y Laimins, 2004).

Es plausible que la unión de E7 a las HDACs esté dirigida a modular la expresión de genes celulares (Longworth y Laimins, 2004) aunque cabe la posibilidad de que ésta también esté dirigida hacia los propios genomas virales, ya que la regulación de los mismos está influida por la organización del genoma viral en la cromatina, en virtud de que el DNA viral se estructura en nucleosomas, que pueden sufrir cambios conformacionales como resultado de la acetilación/desacetilación de histonas, metilación del DNA, y probablemente metilación de histonas (Kalantari *et al.*, 2008).

En cuanto al ciclo viral, se piensa que la infección por HPV requiere de microtraumas del epitelio que expongan a las células basales a la entrada del virus (zur Hausen, 2002; Doorbar, 2005; Hindmarsh y Laimins, 2007), mediada por clatrina (Hindmarsh y Laimins, 2007). En estas células, los genomas virales son mantenidos como episomas en un bajo número de copias. Las oncoproteínas E6 y E7 son entonces capaces de hacer entrar a las células en la fase S, con lo que un subgrupo de células suprabasales amplifican los genomas virales hasta miles de copias, lo cual requiere la expresión de todos los genes tempranos (Doorbar, 2005; Hindmarsh y Laimins, 2007). A lo largo del ciclo viral, los niveles relativos de las diferentes proteínas virales son controladas por el uso de promotores y la selección de sitios diferenciales de *splicing* (Doorbar, 2005) y mecanismos postranscripcionales (Hindmarsh y Laimins, 2007).

Ahora bien, la expresión de los genes tardíos es dependiente de la diferenciación celular. Las oncoproteínas E6 y E7 también retardan la diferenciación, regulando a la baja a los genes encargados de dirigir a la última, manteniendo así a las células en estado de síntesis de DNA, aún después de que han entrado a la capa suprabasal, lo que se piensa,

puede contribuir con el desarrollo de la malignidad (Duffy *et al.*, 2003). No obstante, se sabe que las proteínas estructurales no se expresan en células precancerosas y malignas (zur Hausen, 2002) (ver Figura 8). De hecho, una característica de los virus tumorales es su capacidad para producir tumores cuando su ciclo productivo no puede ser completado (Doorbar, 2005; Levine, 2009), y en células cancerosas asociadas con HPV parte del genoma viral se encuentra integrado en el genoma celular, usualmente en repeticiones en *tandem* que van de unas pocas, hasta miles de copias del mismo (Thierry, 2009). En la integración usualmente se rompe el marco de lectura abierto de *E1* y *E2* (Thierry, 2009; zur Hausen, 2002), y dado que las últimas están involucradas en la replicación del DNA viral, la integración conduce a la interrupción de la replicación del DNA viral (Thierry, 2009). Adicionalmente, se ha demostrado que los genomas virales necesitan ser mantenidos como episomas a fin de inducir las funciones tardías (Longworth y Laimins, 2004), razones ambas, para que la integración interfiera con el ciclo productivo viral.

Por otro lado, se ha demostrado que *E2* puede reprimir la transcripción de *E6* y *E7*, ya que al unirse a sus sitios consenso, dos de ellos próximos a la caja TATA del promotor temprano, previene la formación del complejo de inicio de la transcripción mediante impedimento estérico. Esta modulación negativa de los oncogenes *E6* y *E7* es liberada por la ruptura del marco abierto de lectura de *E2* mediada por la integración. Se piensa que este proceso lleva a altos niveles de transcripción de *E6* y *E7*. De hecho, se han identificado vías regulatorias de auto-activación, donde *E7* puede inducir su propia transcripción (Thierry, 2009). El aumento descontrolado de la expresión de *E7* podría, entonces, estimular la actividad de la DNMT1 en niveles similarmente anormales, estableciendo un mecanismo tendiente a la transformación celular. Esta visión es congruente con diversos reportes que han encontrado un incremento en la metilación del DNA viral conforme hay progresión de las lesiones (Kim *et al.*, 2003; Kalantari *et al.*, 2004; Wiley *et al.*, 2005; Turan *et al.*, 2006; Bhattacharjee, 2006; Turan *et al.*, 2007; Brandsma *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2009).

Se sabe que diversos virus oncogénicos (HPV, SV40, adenovirus, EBV, BKV, HTLV1/2, etc.) explotan mecanismos epigenéticos mediante las proteínas virales descritas como “oncogénicas” (como E6, y E7 en HPV, o el antígeno T en SV40, o E1A en adenovirus), incrementando la actividad de las DNMTs y disminuyendo la acetilación de histonas, probablemente para inactivar genes supresores de tumores, que son alteraciones comunes a procesos oncogénicos no virales (Flanagan, 2007).

Ahora bien, se ha demostrado que en procesos neoplásicos es necesaria la presencia de la DNMT3b (metilación *de novo*), así como de la DNMT1 (metilación de mantenimiento) (Rhee *et al.*, 2002) y la expresión de DNMT3b parece estar fuertemente correlacionada con la infección por HPV 16 o 18, mediante mecanismos aún no claros (Lin *et al.*, 2005) pero que podrían involucrar un aumento en el número de copias de DNMT3b (Woodman *et al.*, 2007). Esto, aunado a una mayor actividad de DNMT1 por acción de E7 (Burgers *et al.*, 2006), sugiere que la metilación del DNA juega un papel clave en el ciclo viral. Por ejemplo, se ha demostrado que en el caso del EBV, la metilación de sus distintos grupos de promotores se asocia con diferentes etapas de la latencia, siendo ello esencial para establecer una infección persistente y contribuir a evadir el sistema inmune (Tao y Robertson, 2003). De hecho, la oncoproteína viral LMP1 de EBV es capaz de activar a las DNMTs 1, 3a y 3b (Tsai *et al.*, 2002; Flanagan, 2007). Estas DNA metiltransferasas, junto con MeCP2 y HDAC1, forman complejos que se localizan en el promotor del gen de *E-cadherina*, cuya expresión se ve reducida (Li *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2002). Análogamente, se ha demostrado que el antígeno T de SV40 tiene la capacidad de alterar los niveles de expresión de diversas isoformas de la DNMT3b, y que la expresión de ésta es esencial para la manifestación de un fenotipo maligno, en adición a la expresión de DNMT1 (Soejima *et al.*, 2003).

Así, a partir de la evidencia experimental surge un panorama en el que los virus oncogénicos requieren, para establecer un ciclo exitoso, entre otras cosas, controlar cuidadosamente los niveles de proteína o la actividad enzimática de las DNMTs, y la

disrupción de este delicado balance puede resultar en caos (Li *et al.*, 2005), en virtud de que las oncoproteínas virales podrían estar dirigidas, también, a la modulación de los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes (Flanagan, 2007), a fin de silenciar a los reguladores clave del crecimiento celular (Li *et al.*, 2005). Muy probablemente esto establece un delicado balance en donde la activación del ciclo celular por parte del virus, es el objetivo real que conduzca completar el ciclo viral, pero alteraciones en este balance pueden llevar el panorama celular transformado hacia un fenotipo maligno, donde el ciclo viral deja de ser productivo. Tradicionalmente se suponía que la metilación del DNA viral era un efectivo método celular para silenciar la expresión viral y mantener la estabilidad genómica silenciando el material genético viral tras su integración (Li *et al.*, 2005), en virtud de que se ha demostrado que entre las consecuencias de la inserción de DNA foráneo están una rápida metilación de éste, así como alteraciones en los patrones de metilación en varios genes y segmentos de DNA celulares (Remus *et al.*, 1999). Así, la metilación *de novo* del DNA de HPV podría ser tanto un mecanismo de defensa celular para evitar la transcripción de genes virales, como una estrategia viral para establecer una infección persistente, o ambos (Woodman *et al.*, 2007). No obstante, dada la amplia evidencia de la capacidad común de estos virus para alterar el panorama epigenético, puede suponerse que la metilación del DNA viral, más que una estrategia celular para su seguridad, es una arriesgada estrategia viral para conseguir un ciclo exitoso.

Aunque ya en esta línea de pensamiento se ha propuesto que los virus podrían beneficiarse de la metilación de su genoma para escapar de ser degradado por los mecanismos que reconocen al DNA viral, los esfuerzos realizados por los virus para modular la metilación del DNA parecen sugerir mecanismos mucho más complejos de regulación. Por ejemplo, la capacidad de las proteínas celulares para interactuar con secuencias virales está influenciada por el estado de metilación de éstas, sugiriendo que este es un mecanismo involucrado en la regulación de los genes que participan en la

interacción virus-hospedero (Verma, 2006). Por otro lado, durante la replicación viral, el genoma de HPV se encuentra hipometilado, observándose incremento en la metilación sólo tras la integración (Hoelzer *et al.*, 2008)

Toda esta evidencia experimental sugiere que la habilidad de manipular cuidadosamente la metilación del DNA forma una parte crucial de la estrategia viral, la cual puede, en ciertas instancias, desembocar en un ciclo no permisivo para el virus y cáncer para el organismo infectado.

Especialmente interesante resultan dos reportes recientes, donde se estudió el patrón de metilación del genoma completo (metiloma) de HPV 16 en lesiones de diferente grado. En uno de ellos se descubrió que el genoma del virus sufre un aumento progresivo en la metilación, desde el tejido de mujeres que son portadoras del virus (sin síntomas) a lesiones pre-tumorigénicas tempranas, a carcinomas primarios; de hecho, el análisis de *L2* y *L1* reveló la presencia de metilación progresiva en *L2* durante la tumorigénesis: 0% en portadoras asintomáticas; 29% en NIC I; 37% en NIC II y III; y 94% en carcinomas primarios. La metilación de *L1* concordó con la de *L2* (Fernandez *et al.*, 2009). En el otro estudio se identificaron tres patrones de metilación, que guardaron una correlación estadísticamente significativa con el diagnóstico patológico: aquéllas con poca metilación (patrón A) se asociaron con las lesiones menos severas; la metilación en varios sitios CpG en *E1* y *E6* (patrón B) se asoció con una severidad intermedia; mientras que una alta frecuencia de metilación, particularmente en *E5*, *L2* y *L1* (patrón C), se asoció con las lesiones más severas (Brandsma *et al.*, 2009). Estos resultados concuerdan con lo observado en el presente estudio, donde la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* permitió determinar un incremento en la metilación de los cuatro sitios CpG estudiados (5602, 5608, 5611 y 5617, ubicados precisamente en la región *L2/L1*), conforme las lesiones incrementaron en severidad, desde NIC I, hasta NIC III (Figuras 22F y 22G). En el presente análisis, puede observarse la presencia de copias desmetiladas en todas las muestras (Figura 22C), lo que sugiere que existe al menos una

copia viral con un bajo nivel de metilación (y transcripcionalmente activa), tal como lo describen van Tine y cols. (van Tine *et al.*, 2004), por otro lado, mientras que en NIC I y NIC II prácticamente no se observaron copias metiladas, en NIC III la situación es completamente otra, detectándose metilación de los sitios estudiados en todas las biopsias bajo estudio (Figura 22F). Este incremento en la metilación en lesiones NIC III bien podría correlacionarse con el evento de integración del genoma viral, ya que se ha demostrado que la integración de un genoma viral en un genoma de mamífero, trae como consecuencia la metilación *de novo* del primero (Doerfler, 2005; Doerfler, 2008).

La existencia de un número limitado de patrones indica que la metilación del genoma de HPV 16 no es un proceso aleatorio, y que la presencia de meCpGs en regiones particulares podría conferir a las células ciertas ventajas selectivas de crecimiento y/o que la metilación de ciertos CpGs es incompatible con una infección continuada (Bransma *et al.*, 2009).

Con base en todo lo anterior, resulta atractivo plantear una hipótesis en donde, inmediatamente después de la infección por HPV 16 a las células basales, inicia la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, que conducirán a la célula a entrar a la fase S del ciclo celular, mediante mecanismos diversos, tales como la bien conocida inactivación de los supresores de tumores p53 (por acción de E6) y RB (por acción de E7), así como mecanismos epigenéticos que incluyen la interacción con HDACs, y el incremento en la expresión y/o actividad de DNMT1 y 3b. Adicionalmente, los genomas virales serán empaquetados en nucleosomas, a fin de mantener un estricto control de la replicación y de la expresión de los genes virales.

Durante esta etapa, las DNMTs podrían mantener algún grado de metilación (aún no establecido) en los sitios CpG ubicados en los genes tardíos *L2* y *L1*. De hecho, en muchos virus parece haber una correlación inversa entre la expresión de genes virales y el grado de metilación, con los genes virales tardíos siendo, en general, más susceptibles a la metilación que los tempranos (Hoelzer *et al.*, 2008). La interacción de las 5-meC con

MeCP2 reclutaría componentes del *spliceosoma*, tales como miembros de SWI-SNF y/o YB1-PPC2 γ , que en conjunto con otros factores celulares (por ejemplo hnRNP A1) determinarían la selección de diversos exones en eventos de *splicing* alternativo. Esto haría posible evitar la producción anticipada de las proteínas de la cápside L2 y L1, ambas altamente inmunogénicas, como un mecanismo de escape a la vigilancia inmunológica. El aumento en la diferenciación celular encenderá diversas vías de señalización que resultarán en la producción de los mRNAs tardíos (con la consecuente expresión de L2 y L1), bien mediante la fosforilación de PPC2 γ , y/o mediante cambios en los patrones de metilación de los sitios CpG de la región tardía, estableciendo un potencial vínculo directo entre la metilación del DNA y el *splicing* alternativo.

Ahora bien, debido a razones no del todo claras, tal vez relacionadas con poca permisividad de las células infectadas, tras una infección persistente, en ocasiones el DNA viral llega a integrarse al genoma del hospedero, con la consecuente ruptura del marco abierto de lectura de E2. Se ha sugerido que este es el paso determinante para la progresión de las lesiones, en parte porque ello desemboca en el incremento de la expresión de E6 y E7, con un aumento en las actividades asociadas con estas proteínas, y la sobreactivación de todas aquéllas vías de señalización con cuyos efectores interactúan, impulsando y dirigiendo la transformación maligna de estas células. Puede especularse que una de las actividades alteradas será la de DNMT1 (y probablemente también 3b). Esto es congruente con las observaciones de alteraciones en los patrones de metilación del genoma celular y la metilación *de novo* del DNA viral integrado (Doerfler, 2008; Remus *et al.*, 1999), y con los resultados de este análisis que revelan un aumento en la metilación del DNA de HPV 16 en la región L2/L1 en NIC III.

Es atractivo sugerir que esto podría explicar el aumento en la metilación observado en diversos estudios, en la región tardía en lesiones avanzadas, así como patrones no heterogéneos de metilación en la LCR, ya que de darse ésta, podría reprimirse la expresión de las oncoproteínas del HPV. Así, se establece un mecanismo plausible de

selección de aquellas células que mantengan desmetilada la *LCR* y los genes tempranos, aunado a una presión selectiva a mantener metilados los genes tardíos, cuyos productos son muy inmunogénicos. Este mecanismo también contribuye a explicar en parte la falta de expresión de las proteínas tardías en células neoplásicas, observada ya desde hace muchos años y correlacionada con un aumento de la metilación del DNA de los papilomavirus (Wettstein y Stevens, 1983).

Los resultados del presente estudio son congruentes con los reportes recientes de los metilomas de HPV 16 durante la evolución de las lesiones hacia cáncer cervicouterino, lo que contribuye a validar el uso de la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops*.

Dentro de las posibles aplicaciones futuras de esta técnica se encuentra el análisis de la metilación de genes tanto virales como celulares; el eventual desarrollo de biomarcadores para diversos tipos de cáncer; así como el monitoreo de terapias epigenéticas que se basen en la administración de inhibidores de la metilación del DNA.



Conclusiones

“Durante mucho tiempo las mujeres han quedado indefensas, abandonadas como un campo sin cerca, sin que ningún campeón luche en su ayuda. Cuando todo hombre de bien tendría que asumir su defensa, se ha dejado, sin embargo, por negligencia o indiferencia que las mujeres sean arrastradas por el barro. [...] Ha llegado la hora de quitar de las manos del faraón una causa tan justa.”

CRISTINA DE PIZÁN. “LA CIUDAD DE LAS DAMAS”. 1405.

“[...] Algún tiempo tu fuerza
tendrás todavía, mas luego de ella
te habrán de privar la dolencia o la espada,
el abrazo del fuego o la furia del mar,
el golpe del hierro o la lanza que vuela”

ANÓNIMO ANGLOSAJÓN. “BEOWULF” vv. 1761-1765. S. VIII.

“-Después de todo –murmuró, sin dirigirse a nadie en particular-
el ajedrez es una combinación de impulsos hostiles...”

ARTURO PÉREZ-REVERTE. “LA TABLA DE FLANDES”. 1990

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la metilación de 4 sitios CpG localizados en la región *L2/L1* de HPV 16 mediante la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* y así validar su uso como potencial marcador de incremento en la severidad de las lesiones hacia cáncer cervicouterino.

Se estableció, en primer lugar, que es necesario el empleo de una enzima de alta fidelidad que produzca extremos romos, tal como la *Pfu* DNA polimerasa, ya que la actividad desoxinucleotidil-terminal transferasa (TdT) inherente a la *Taq* DNA polimerasa interfiere importantemente con la capacidad de discriminación de los *Headloops*. El

presente diseño permite evaluar hasta cuatro sitios CpG y en ciertas instancias, incluso tan pocos como tres, aunque dos y un sitio no proporcionaron suficiente capacidad discriminatoria independientemente de los parámetros ajustados. En cuanto a la metilación mosaico, se observó que el efecto desestabilizador de cada desapareamiento entre la Cabeza y el *Amplicón*, no es igual para todos los *Headloops*, sino que es altamente dependiente del contexto, por lo que debería tenerse cuidado al aplicar e interpretar esta técnica en una prueba clínica.

El límite de discriminación de la técnica, cuando se evalúa en tiempo final, es de una copia de la secuencia blanco en un fondo de 100 copias de secuencia competidora, aunque potencialmente se puede detectar hasta 1:10⁶, en particular acoplando el diseño a PCR en tiempo real, con el uso de sondas *Taqman* especialmente diseñadas para una u otra secuencia. En cuanto a la sensibilidad de la técnica, se observó que la presencia de DNA diferente a la secuencia blanco (p. ej. DNA genómico) disminuye de manera importante el límite de detección. No obstante, este obstáculo puede ser fácilmente superado aplicando la técnica de Amplificación/Supresión en una PCR anidada.

Esta técnica, aplicada a biopsias cervicales de lesiones de diverso grado histológico (NIC I a III) y líneas celulares (CaSki y SiHa), reveló que la metilación de los sitios 5602, 5608, 5611 y 5617, localizados en la región *L2/L1* de HPV 16, incrementa de forma paralela a la severidad de la lesión.

La futura aplicación de la técnica de Amplificación/Supresión de la PCR por *Headloops* como herramienta pronóstica aún requerirá afinar detalles tales como el acoplamiento a PCR en tiempo real, y el papel exacto de la metilación mosaico sobre el desempeño de los *Headloops*.

Otras posibles aplicaciones de los *Headloops* incluyen su uso en la investigación básica para el estudio de la metilación en genes tanto virales como celulares, así como aplicaciones clínicas, por ejemplo, para el desarrollo de biomarcadores para diversos tipos

de cáncer, o el monitoreo y seguimiento de terapias epigenéticas con inhibidores de la metilación del DNA.

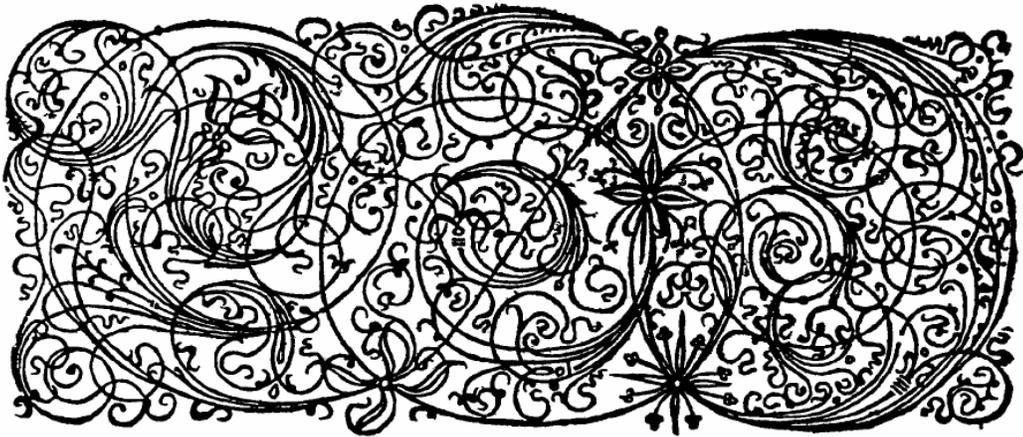
El análisis de los patrones de metilación de la región *L2/L1* en muestras de cáncer oral realizado durante la estandarización de la técnica de los *Headloops* demostró que, aunque en una misma biopsia los patrones suelen ser consistentes entre sí, estando hipermetilados o bien hipometilados, no es posible establecer una correlación entre el grado de metilación y el estadio del tumor, sugiriendo que las alteraciones epigenéticas asociadas con la progresión del cáncer bucal son diferentes de aquéllas del cáncer cervicouterino.

Por otro lado, el análisis *in silico* de la región *L2/L1* de diversos HPVs reveló la presencia de sitios CpG relativamente conservados. Éstos pueden variar en número y posición, aunque en general, se encuentran presentes. Es interesante la existencia de una señal aceptora de *splicing* altamente conservada inmediatamente río arriba del codón de inicio de *L1*, lo que podría sugerir una posible relación entre la metilación de estos sitios y el control del *splicing* alternativo dentro del ciclo viral, especialmente en virtud de que estudios recientes han encontrado asociaciones entre la proteína MeCP2 y el *spliceosoma*. Establecer definitivamente esta asociación requerirá de futuros estudios.

Diversos virus oncogénicos, entre ellos los HPVs, tienen la capacidad de modular el panorama epigenético celular, lo que probablemente contribuye a establecer infecciones persistentes a través de la evasión del sistema inmune, modulando finamente la expresión de las inmunogénicas proteínas L2 y L1 en coordinación con la diferenciación celular, tal vez mediante una conexión, aunque plausible aún no confirmada, entre la metilación del DNA y el *splicing* alternativo.

La integración del DNA viral, que está asociada con un aumento en la severidad de las lesiones precursoras, resulta en alteraciones en la metilación del genoma celular, así como en metilación *de novo* del DNA integrado. Esto podría romper el delicado balance epigenético establecido por el virus, contribuyendo aún más al desarrollo de cáncer, lo

que es coherente con diversos estudios que han observado incremento en la metilación de los genes virales tardíos de forma paralela a la progresión. El hecho de que los resultados del presente análisis sean congruentes con tales reportes, valida la utilidad de los *Headloops* para el estudio de la metilación del DNA.



«La oscuridad de este mundo no es sino una sombra.

Tras ella, justo al alcance de nuestra mano, se encuentra la alegría.

En el corazón de esa oscuridad brillan un resplandor y una alegría inefables,
siempre y cuando sepamos verlos. Y para verlos, les basta mirar.

Les ruego solamente que miren. La vida está tan llena de sentido,
tan llena de belleza por debajo de su envoltura.

Se darán cuenta que la tierra no hace más que encubrir su cielo.

¡Ánimo!, pues, para reclamarlo. Nada más. Pero ustedes tienen valor y saben
bien que somos nosotros aquellos peregrinos que pasan por tierras
desconocidas, para alcanzar el tesoro prometido.»

FRA ANGELICO (c. 1395-1455). INÉDITO CITADO POR ÉRIC DE CLERMONT-TONNERRE

Referencias

1. Adams VH, McBryant SJ, Wade PA, Woodcock CL, Hansen JC. Intrinsic disorder and autonomous domain function in the multifunctional nuclear protein, MeCP2. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 15057-15064.
2. Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, García-Cuellar CM, Guido-Jiménez M, Méndez-Martínez R, García-Carrancá A. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 189-197.
3. Angelov D, Vitolo JM, Mustkov V, Dimitrov S, Hayes JJ. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98: 6599-6604.
4. Allemand E, Hastings ML, Murray MV, Myers MP, Krainer AR. Alternative splicing regulation by interaction of phosphatase PP2C γ with nucleic acid-binding protein YB-1. *Nature Structural & Molecular Biology* 2007; 14: 630-638.
5. Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; 88: 10148-10152.
6. Badal V, Chuang LSH, Tan EHH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BFL, Bernard HU. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of Virology* 2003; 77: 6227-6234.
7. Balderas-Loaeza A, Anaya-Saavedra G, Ramírez-Amador VA, Guido-Jimenez MC, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Bernard HU, García-Carranca A. Human papillomavirus-16 DNA methylation patterns support a causal association of the virus with oral squamous cell carcinomas. *International Journal of Cancer* 2007; 120: 2165-2169.
8. Batsché E, Yaniv M, Muchardt C. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006; 13: 22-29.
9. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trends in Genetics* 2000; 16: 168-174.
10. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer – a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:107-116.
11. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005; 2: S4-S11.
12. Berg M, Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *Journal of Virology* 1997; 71: 3853-3863.
13. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology* 2006; 354: 280-285.
14. Blackburn GM, Gait MJ. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 2^a ed. Nueva York: Oxford University Press, 1996: Capítulo 7.
15. Bloom M, Freyer G, Micklos D. *Laboratory DNA science*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1996.
16. Bock C, Walter J, Paulsen M, Lengauer T. CpG island mapping by epigenome prediction. *PLoS Computational Biology* 2007; 3: 1055-1070.
17. Bransma JL, Sun Y, Lizardi PM, Tuck DP, Zelterman D, Haines III GK, Martel M, Harigopal M, Schofield K, Neapolitano M. Distinct human papillomavirus type 16 methylomes in cervical cells at different stages of premalignancy. *Virology* 2009; doi: 10.1016/j.virol.2009.03.029.
18. Brena MR, Huang THM, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *Journal of Molecular Medicine* 2005; DOI 10.1007/s00109-005-0034-0.

19. Brinton LA. Epidemiology of cervical cancer – Overview. En: Muñoz N, Bosch F X, Shah K V, Meheus A (Eds.). The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. Lyon: International Agency for Research on Cancer (WHO), 1992: 3-23.
20. Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR. Modulation of non-templated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 1996; 20: 1104-1010.
21. Bulk S, Berkhof J, Bulkman NWJ, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Snijders PJF, Meijer CJLM. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Netherlands. *British Journal of Cancer* 2006; 94: 171-175.
22. Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 2006; doi : 10.1083/sj.onc.1209950.
23. Burnett TS, Sleeman JP. Uneven distribution of methylation sites within the human papillomavirus 1a genome: possible relevance to viral gene expression. *Nucleic Acids Research* 1984; 12: 8847-8860.
24. Cavalli F. Cancer in the developing world: can we avoid the disaster? *Nature Clinical Practice Oncology* 2006; 3: 582, 583.
25. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology* 1995; 69: 3074-3083.
26. Chan TS, Yuen ST, Kong CK, et al. Heritable germline epimutation of *MSH2* in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genetics* 2006; 38: 1178-1183.
27. Chen YIG, Moore RE, Ge HY, Young MK, Lee TD, Stevens SW. Proteomic analysis of *in vivo*-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. *Nucleic Acids Research* 2007; 35: 3928-3944.
28. Cheunim T, Zhang J, Milligan SG, McPhillips MG, Graham SV. The alternative splicing factor hnRNP A1 is up-regulated during virus-infected epithelial cell differentiation and binds the human papillomavirus type 16 late regulatory element. *Virus Research* 2008; 131: 189-198.
29. Clark JM. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 1988; 16: 9677-9686.
30. Cline J, Braman JC and Hogrefe HH. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* 1996; 24: 3546-3551.
31. Cloos PAC, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K. The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* 2006; 442: 307-311.
32. Costa GL, Gafsky A and Weiner MP. Cloning and Analysis of PCR-generated DNA fragments. *PCR Methods and Applications* 1994; 3: 338-345.
33. Costa GL, Weiner MP. Protocols for cloning and analysis of blunt-ended PCR-generated DNA fragments. *PCR Methods and Applications* 1994; 3: S95-S106.
34. Cumming SA, Im TC, Milligan SG, Graham SV. Human papillomavirus type 16 late gene expression is regulated by cellular RNA processing factors in response to epithelial differentiation. *Biochemical Society Transactions* 2008; 36:522-524.
35. Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22: 4632-4642.
36. Denissenko MF, Chen JX, Tang MS, Pfeifer GP. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human *p53* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 3893-3898.
37. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomavirus. *Virology* 2004; 324: 17-27.
38. Doerfler W. On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry (Moscow)* 2005. 70:505-524.
39. Doerfler W. In pursuit of the first recognized epigenetic signal – DNA methylation. A 1976 to 2008 synopsis. *Epigenetics* 2008; 3: 125-133.
40. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S: S7-S15.
41. Dueñas-González A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005; 4: 38-62.
42. Duffy CL, Phillips SL, Klingelutz AJ. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes

- regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 2003; 314: 196-205.
43. Engelstad LP, Stewart SL, Nguyen BH, Bedeian KL, Rubin MM, Pasick RJ, Hiatt RA. Abnormal Pap smear follow-up in a high risk population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2001; 10: 1015-1020.
 44. Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Bertino PM. Predicting aberrant CpG island methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 12253-12258.
 45. Fernández AF, Rosales C, López-Nieva P, *et al.* The dynamic methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Research* 2009; 19: 438-451.
 46. Flanagan JM. Host epigenetic modifications by oncogenic viruses. *British Journal of Cancer* 2007; 96: 183-188.
 47. Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 506-511.
 48. Frattini MG, Lim HB, Doorbar J, Laimins LA. Induction of human papillomavirus type 18 late gene expression and genomic amplification in organotypic cultures from transfected DNA templates. *Journal of Virology* 1997; 71: 7068-7072.
 49. Fraumeni JF Jr, Lloyd JW, Smith EM, Wagoner JK. Cancer mortality among nuns: role of marital status in etiology of neoplastic disease in women. *Journal of the National Cancer Institute* 1969; 42: 455-468.
 50. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 1827-1831.
 51. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007; 128: 635-638.
 52. Graveley BR. Alternative splicing: regulation without regulators. *Nature Structure & Molecular Biology* 2009; 16: 13-15.
 53. Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, *et al.* Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nature Genetics* 2005; 37: 254-264.
 54. Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 16719-16724.
 55. Heinrichs A. Fine-tuning tools. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006; 7: 466, 468.
 56. Helt AM, Galloway DA. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 2003; 24: 159-169.
 57. Henken FE, Wilting SM, Overmeer RM, *et al.* Sequential gene promoter methylation during HPV-induced cervical carcinogenesis. *British Journal of Cancer* 2007; 97: 1457-1464.
 58. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 9821-9826.
 59. Hermann A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 48350-48359.
 60. Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, *et al.* Persistence of type-specific human papilloma virus infection among cytologically normal women. *The Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 235-240.
 61. Hindmarsh PL, Laimins LA. Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virology Journal* 2007; 4: 19-30.
 62. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338: 423-428.
 63. Ho GYF, Burk RD, Klein S, *et al.* Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 1995; 87: 1365-1371.
 64. Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Research* 2008; 36: 2825-2837.
 65. Howley, PM, Lowy, DR. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: Vol. 2: Capítulo 65.

66. Huang, M-M, Arnheim N and Goodman M F. Extension of base mispairs by *Taq* DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research* 1992; 20: 4567-4573.
67. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KID, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic Oncology* 2004; 92: 873-880.
68. Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T. PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells* 2002; 7: 997-1007.
69. Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RWC, Baylin SB, Schuebel KE. *De novo* CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Research* 2006; 66: 682-692.
70. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 1999; 21: 163-167.
71. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ, Bernard HU. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *Journal of Virology* 2004; 78: 12762-12772.
72. Kalantari M, Lee D, Calleja-Macias IE, Lambert PF, Bernard HU. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology* 2008; 374: 292-303.
73. Kang S, Kim JW, Kang GH, Lee S, Park NH, Song YS, Park SY, Kang SB, Lee HP. Comparison of DNA hypermethylation patterns in different types of uterine cancer: cervical squamous cell carcinoma, cervical adenocarcinoma and endometrial adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* 2006; 118: 2168-2171.
74. Katz IT, Wright AA. Preventing cervical cancer in the developing world. *New England Journal of Medicine* 2006; 354: 11.
75. Kessis T D, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 3988-3992.
76. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *Journal of Virology* 2003; 77: 12450-12459.
77. Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ and Wang A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications* 1994; 3: S39-S47.
78. Levine AJ. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: the inactivation of tumor suppressor genes: p53. *Virology* 2009; 384: 285-293.
79. Lewin B. Genes VIII. Nueva Jersey: Pearson Prentice Hall, 2004.
80. Li HP, Leu YW, Chang YS. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Research* 2005; 15: 262-271.
81. Liaw K L, Glass AG, Manos MM, *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91: 954-960.
82. Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Letters* 2005; 226: 77-84.
83. Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *Journal of Virology* 2004; 78: 3533-3541.
84. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British Journal of Cancer* 2008; 98: 1881-1885.
85. Lowy DR, Howley PM. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: Vol. 2: Capitulo 66.
86. Marlow LAV, Waller J, Wardle J. Public awareness that HPV is a risk factor for cervical cancer. *British Journal of Cancer* 2007; 97: 691-694.
87. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 2009; 384: 335-344.

88. Melsheimer P, Kaul S, Dobeck S, Bastert G. Immunocytochemical detection of HPV high-risk type L1 capsid proteins in LSIL and HSIL as compared with detection of HPV L1 DNA. *Acta Cytologica* 2003; 47: 124-128.
89. Milligan SG, Veerapradistin T, Ahamet B, Mole S, Graham SV. Analysis of novel human papillomavirus type 16 late mRNA in differentiated W12 cervical epithelial cells. *Virology* 2007; 360: 172-181.
90. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. HPV type-specific risks of high-grade CIN during 4 years of follow-up: A population-based prospective study. *British Journal of Cancer* 2007; 97: 129-132.
91. Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 4598-4606.
92. Nikitina T, Ghosh RP, Horowitz-Scherer RA, et al. MeCP2-chromatin interactions include the formation of chromosome-like structures and are altered in mutations causing Rett syndrome. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 28237-28245.
93. Nilsen TW. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* 2003; 25: 1147-1149.
94. Öberg D, Fay J, Lambkin H, Schwartz S. A downstream polyadenylation element in human papillomavirus type 16 L2 encodes multiple GGG motifs and interacts with hnRNP H. *Journal of Virology* 2005; 79: 9254-9269.
95. Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell* 2002; 108: 439-451.
96. Petersen I, Klein F. HPV bei nichtgynäkologischen Tumoren. *Pathologe* 2008 [Suppl 2] 29: 118-122.
97. Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 2002; 108: 501-512.
98. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2008; 5: 24-31
99. Ramsahoye BH, Binizskiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 5237-5242.
100. Rand KN, Ho T, Qu W, Mitchell SM, White R, Clark SJ, Molloy PL. Headloop suppression PCR and its application to selective amplification of methylated DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 2005; 33: e127.
101. Reeskin-Peters N, Wisman GBA, Jerónimo C, et al. Detecting cervical cancer by quantitative promoter hypermethylation assay on cervical scrapings: A feasibility study. *Molecular Cancer Research* 2004; 2: 289-295.
102. Remus R, Kämmer C, Heller H, Schmitz B, Schell G, Doerfler W. Insertion of foreign DNA into an established mammalian genome can alter the methylation of cellular DNA sequences. *Journal of Virology* 1999; 73: 1010-1022.
103. Rhee I, Bachman KE, Park BH, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-556.
104. Richards EJ, Elgin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 2002; 108: 489-500.
105. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics* 2005; 6: 597-610.
106. Rosl F, Arab A, Klevenz B, zur Hausen H. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *Journal of General Virology* 1993; 74: 791-801.
107. Santini V, Kantarjian HM, Issa JP. Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Annals of Internal Medicine* 2001; 134: 573-586.
108. Santos-Rebouças CB, Pimentel MMG. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *European Journal of Human Genetics* 2007; 15: 10-17.
109. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of the American Medical Association* 2001; 286: 3106-3114.
110. Sci. Am. Editorial board. Twelve major cancers. *Scientific American* 1996; September: 126-132.
111. Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *Journal of Experimental Medicine* 1933; 58: 607-624.

112. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood* 1999; 93: 4059-4070.
113. Soekima K, Fang W, Rollins BJ. DNA methyltransferase 3b contributes to oncogenic transformation induced by SV40T antigen and activated Ras. *Oncogene* 2003; 22: 4723-4733.
114. Somberg M, Zhao X, Fröhlich M, Evander M, Schwartz S. Polypirimidine tract binding protein induces human papillomavirus type 16 late gene expression by interfering with splicing inhibitory elements at the major late 5' splice site, SD3632. *Journal of Virology* 2008; 82: 3665-3678.
115. Somberg M, Rush M, Fay J, Ryan F, Lambkin H, Akusjärvi G, Schwartz S. Adenovirus E4orf4 HPV-16 late L1 mRNA production. *Virology* 2009; 383: 279-290.
116. Stickeler E, Fraser SD, Honig A, Chen AL, Berget SM, Cooper TA. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the *CD44* alternative exon v4. *The EMBO Journal* 2001; 20: 3821-3830.
117. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403: 41-45.
118. Tao Q, Robertson KD. Stealth technology: how Epstein-Barr virus utilizes DNA methylation to cloak itself from immune detection. *Clinical Immunology* 2003; 109: 53-63.
119. Thatcher KN, LaSalle JM. Dynamic changes in histone H3 lysine 9 acetylation localization patterns during neuronal maturation require MeCP2. *Epigenetics* 2006; 1: 24-31.
120. Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 2009; 384: 375-379.
121. Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Smet A, Zehbe I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutation* 2003; 21: 307-312.
122. Toro M, Llombart-Bosch A. Detección inmunohistoquímica de la proteína L1 de virus papiloma humano (HPV) de alto riesgo en citologías y biopsias de cuello uterino. *Revista Española de Patología* 2005; 38: 8-13.
123. Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the down-regulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 0084-10089.
124. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias IE, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL, Skomedal H, Barrera-Saldaña HA, Bernard HU. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: A biomarker of neoplastic progression? *Virology* 2006; 349: 175-183.
125. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie HA, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology* 2007; 361: 185-193.
126. Van Tine BA, Cappes JC, Banerjee NS, et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *Journal of Virology* 2004; 78: 11172-11186.
127. Venables JP, Klinck R, Koh CS, et al. Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* 2009; 16: 670-676.
128. Verma M. Viral genes and methylation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 983:170-180.
129. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology* 2000; 81: 2959-2968.
130. Wade PA. SWItching off methylated DNA. *Nature Genetics* 2005; 37: 212, 213.
131. Wallin KL, Wiklund F, Ångström T, Bergman F, Stendhal U, Wadell G, Hallmans G, Dillner J. Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341: 1633-1638.
132. Wettstein FO, Stevens JG. Shope papilloma virus DNA is extensively methylated in non-virus-producing neoplasms. *Virology* 1983; 126: 493-504.
133. White DO, Fenner FJ. Medical Virology. 4^a ed. San Diego: Academic Press, 1994: Capítulo 18.
134. Widschwendter A, Gatringer C, Ivarsson L, et al. Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 3396-3400.
135. Wiley DJ, Huh J, Rao JY, Chang C, Goetz M, Poulter M, Masongsong E, Chang CI, Bernard HU.

- Methylation of human papillomavirus genomes in cells of anal epithelia of HIV-infected men. *Journal of the Acquired Immune Deficiency Syndrome* 2005; 39: 143-151.
136. Woodman CBJ, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *The Lancet* 2001; 357: 1831-1836.
137. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7: 11-22.
138. Young JI, Hong EP, Castle CJ, *et al.* Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 17551-17558.
139. Zhao X, Schwartz S. Inhibition of HPV-16 L1 expression from L1 cDNAs correlates with the presence of hnRNP A1 binding sites in the L1 coding region. *Virus Genes* 2008; 36: 45-53.
140. Zheng Z-M, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience* 2006; 11: 2286-2302.
141. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* 1991; 254: 1167-1173.
142. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 342-350.

