



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ANÁLISIS DE LOS PATRONES
DE METILACIÓN EN EL ADN DEL VIRUS
DE PAPILOMA HUMANO TIPO 16 EN
CÁNCER BUCAL

T E S I S

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

P R E S E N T A :

ADRIANA V. BALDERAS LOAEZA



Tutor: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

MÉXICO, D. F.

Junio 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Alejandro García Carrancá por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en su laboratorio.

Miriam Guido por su disposición y enseñanza del trabajo de laboratorio.

Dra Itzel Calleja por su asesoría en el análisis e interpretación de los resultados y por compartir generosamente sus conocimientos conmigo.

Y sobre todo al Dr. Hugo Santamaría Suárez por los consejos, apoyo académico y su generosa ayuda hasta la conclusión de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio y del hospital por sus consejos y por los buenos momentos.

Dedicado a:

*Mi adorada mamá, Sra Ana Loaeza Brena
por su apoyo total e incondicional, por enseñarme el camino de la honestidad,
responsabilidad y respeto*

*Mi papá el Sr. Enrique Balderas
Por enseñarme a ser una persona comprometida*

*Mi querida abuela:
Mamá Lupe*

Mis hermanas Paty y Sayneth y a mi hermano Enrique

*Mis adorables niños:
Fany, Davidcito, Carlitos, Enriquito y Manuelito.*

Mis amigas y amigos

ÍNDICE GENERAL

TABLA DE CONTENIDO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	1
Introducción	1
1.1 El Cáncer de la Cavidad Bucal	1
1.1.1 Características clínicas del carcinoma epidermoide de cavidad bucal	2
1.1.2 Factores de riesgo para el cáncer bucal	2
1.2 Los virus de papiloma humano y cáncer	3
1.2.1 Los virus de papiloma humano y cáncer de la cavidad bucal	4
1.3 Taxonomía y morfología de los papilomavirus	7
1.3.1. El Genoma de los papilomavirus	7
1.3.2. Mecanismos de infección viral	9
1.3.3. Ciclo reproductivo y replicación de los papilomavirus	10
1.3.4. Patrón de transcripción viral durante la carcinogénesis	13
1.3.5. Procesos oncogénicos de los VPH, la función de las oncoproteínas	14
1.3.6. La proteína viral E2 modula la transcripción y replicación viral	15
1.3.7. El promotor p97 de VPH-16	16
1.3.8. El enhancer de VPH-16	18
1.3.8.1. Reguladores positivos de del enhancer de VPH-16	19
1.3.8.2. El regulador negativo de VPH-16	19
1.3.9. Organización de nucleosomas de VPH-16	21
1.4. Metilación del DNA y su posible función en la carcinogénesis	22
1.4.1. La metilación del DNA es un proceso celular normal	22
1.4.2. Represión transcripcional por metilación del DNA	25
1.4.2.1. Mecanismos de silenciamiento transcripcional por mutilación del DNA	25
1.4.3. Mutilación del DNA y cáncer	27
	28

1.4.3.1 Mutaciones puntuales C → Ten células cancerosas	30
1.4.3.2 Hipometilación del DNA y cáncer	
1.4.3.2.1 hipometilación como indicador diagnóstico y pronóstico	30
1.4.3.3 Hipermetilación de genes supresores de tumor y cáncer	31
1.4.3.3.1 Hipermetilación como marcador pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento en cáncer	32
1.4.4 Metilación del DNA de los papilomavirus	33
1.4.4.1 Los incios de los estudios de metilación de DNA en papilomavirus	34
1.4.4.2 Ciclo de vida y metilación de papilomavirus	35
1.4.4.3 Metilación de DNA en los VPH y cáncer	35
Capítulo II	38
Justificación, hipótesis y objetivos	38
2.1 Justificación	38
2.2 Hipótesis	38
2.3 Objetivos	39
2.3.1 Objetivo General	39
2.3.2 Objetivos particulares	39
Capítulo III	40
Materiales y métodos	40
3.1 Materiales biológicos y reactivos	40
3.1.1 Material biológico	40
3.1.2 Población de estudio para el análisis de mutación en CECB	41
3.1.3 Reactivos	43
3.2 Métodos	44
3.2.1 Colección y procesamiento de muestras	44
3.2.2 Extracción del DNA genómico	44
3.2.3 Cuantificación y verificación de la calidad del DNA genómico	45
3.2.3.1 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa	45
3.2.4 Detección del virus de papiloma humano tipo 16 por PCR	46
3.2.5 Determinación del estado de metilación del DNA del VPH-16 en CECB	46
3.2.5.1 Líneas celulares como control	46
3.2.5.2 Modificación del DNA con bisulfito de sodio	46
3.2.5.3 Diseño de oligos msp	47
3.2.5.4 Amplificación por PCR del DNA modificado	50
3.2.5.5 Clonación y transformación de los productos amplificados	50
3.2.5.6 PCR de colonia	51
3.2.5.7 Limpieza de los productos de PCR de colonia	52
3.2.5.8 Reacción de secuencia	52
3.2.5.9 Purificación de los productos de la reacción de secuencia	52
3.2.5.10 Análisis de secuencias y determinación del patrón de metilación	53
Capítulo IV	54
Resultados	54
4.1 El virus de papiloma humano predominó en CECB	54
4.2 Frecuencia de los tipos de VPH detectados en CECB	55

4.3	Diseño del estudio para el análisis de metilación	56
4.3.1	Los oligos msp solo amplifican DNA modificado	58
4.3.2	Clonación y análisis de secuencias	59
4.4	Diferente patrón de metilación en las líneas celulares SiHa y CaSki	61
4.4.1	Hipermetilación y no metilación en la línea celular SiHa	61
4.4.2	Heterogeneidad en el patrón de metilación de la línea celular CaSki	63
4.5	No metilación del VPH-16 en muestras control	64
4.6	Metilación en casos con CECB	65
4.6.1	La mayoría de las muestras de CECB se amplifican exitosamente	65
4.6.2	No hubo correlación entre en consumo de tabaco, alcohol y los patrones de metilación	66
4.6.3	Diferentes frecuencias de metilación de 36 CpGs del gen L1 y LCR en CECB	66
4.6.4.1	La metilación del enhancer	70
4.6.4.2	Las regiones 3' del gen L1 y 5' de la LCR de CECB se encuentran hipermetiladas	70
4.6.4.3	La zona de splicing de L2/L1 presento hipermetilación homogénea	72
4.6.5	La región media del gen L1 y el segmento internucleosomal de la LCR estuvieron hipometiladas en CECB	72
	Capítulo V	74
	Discusión	74
	Capítulo VI	83
	Conclusiones	83
	Capítulo VII	85
	Perspectivas	85
	Capítulo VIII	86
	Referencias	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organización genómica de VPH-16 y los elementos de la LCR	8
Figura 2	Patrones de expresión viral durante el ciclo productivo de VPH-16	12
Figura 3	Alteraciones en los patrones de expresión viral durante la carcinogénesis	12
Figura 4	Elementos de respuesta en cis para la proteína viral E2 en la LCR de VPH-16	15
Figura 5	Activación del promotor y el efecto represor de E2 en VPH-16	17
Figura 6	Factores en trans que reconocen y activan la LCR en VPH-16	20
Figura 7	El silenciador y reguladores negativos de la LCR de VPH-16	20
Figura 8	Metabolismo de la citosina	23
Figura 9	Metilación del DNA y represión transcripcional	26
Figura 10	Posibles mecanismos de carcinogénesis por metilación del DNA	29
Figura 11	Productos de los pares de oligonucleótidos msp en relación a los sitios CpGs del 3' del gen L1 y la LCR	49
Figura 12	Productos de los pares de oligonucleótidos msp en relación a los sitios CpGs del 3' del gen L2 y el gen L1 del genoma de VPH-16	50
Figura 13	Presencia del gen E6 de VPH tipo 16 en cinco casos de CECB	54
Figura 14	Distribución genómica de 19 CpGs en la LCR y 3' de L1 del VPH-16	57
Figura 15	Distribución genómica de 16 CpGs del gen L1	58
Figura 16	Amplificación de DNA modificado de la región LCR y parte de L1 con oligos msp	59
Figura 17	El promotor y la región 3' de L1/5' de la LCR en la línea celular CaSki fueron clonadas	60
Figura 18	Secuencia de DNA con CpGs metiladas y no metiladas	61
Figura 19	No metilación en la LCR e hipermetilación en 3' de L1 de la línea celular SiHa	62
Figura 20	Heterogeneidad en la metilación de la línea celular CaSki	63
Figura 21	No metilación de la LCR en infecciones asintomáticas	64
Figura 22	El promotor fue amplificado en la mayoría de las muestras de CECB	65
Figura 23	Productos de los pares de oligonucleótidos msp en relación a los 35 CpGs del extremo 3' del gen L2 y el gen L1 del genoma de VPH-16	66
Figura 24	Frecuencia de metilación en 35 CpGs del gen L1 y LCR de VPH-16 en CECB	67
Figura 25	Heterogeneidad en la metilación de la región 3' de L1 y LCR de VPH 16 de CECB	69
Figura 26	Heterogeneidad en la metilación del gen L1 de VPH 16 en biopsias de CECB	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Características demográficas y clínicas de los pacientes con CECB y VPH-16 incluidos en este estudio	42
Tabla 2	Secuencia de oligonucleótidos msp que amplifican el extremo 3' del gen L1 y la LCR del genoma de VPH-16	48
Tabla 3	Secuencia de oligonucleótidos msp (methylation sensitive PCR) que amplifican el gen L1 y extremo 3' del gen L2 del genoma de VPH-16	49
Tabla 4	Prevalencia de diferentes tipos de VPH en 27 de 62 muestras de CECB	55

ABREVIATURAS

AP 1	Proteína activadora 1
AT	Secuencia de Adenina y Timina
ATP	Adenosin Tri Fosfato
C	Citosina
CaCU	Cáncer Cervicouterino
CB	Cáncer Bucal
CDP	Proteína de desplazamiento de la caja CAAT
CECB	Carcinoma Epidermoide de la Cavidad Bucal
CECC	Carcinoma Epidermoide de Cabeza y cuello
CpG	Dinucleótido de Citosina y Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	Enzimas metiltransferasa de DNA
dNTPs	Trifosfato de desoxinucleósidos
E2	Proteína reguladora de expresión temprana de VPH
E6	Oncoproteína de expresión temprana de VPH
E7	Oncoproteína de expresión temprana de VPH
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
Exo-1	Exonucleasa 1
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
GTFs	Factores de transcripción generales
HAT	Histona acetil transferasa
HDACs	Desacetilasas de histónas
IARC	Agencia Internacional en la Investigación de Cáncer
L1	Proteína L1 de expresión tardía del VPH
L2	Proteína L2 de expresión tardía de VPH
LB	Medio de cultivo Luria
LCR	Región Larga de Control (long control región)
MARS	Regiones de Unión a la Matriz Nuclear
MBD	Dominio de unión a grupos metilo
MeCP2	Proteína de unión a DNA metilado y dominio MBD
meCpG	Dinucleótido CG metilado
MHC-1	Complejo Mayor de Histocompatibilidad 1
mRNA	RNA mensajero
MSPF	Factor de transcripción sensible a metilación
NF 1	Factor de transcripción nuclear 1
NIC 1	Neoplasia intracervical 1
NIC 2	Neoplasia intracervical 2
NIC 3	Neoplasia intracervical 3
Oct 1	Factor de transcripción octamérico 1
P670	Promotor tardío de VPH 16
P97	Promotor temprano de VPH 16
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PIC	Complejo de preinicio de la transcripción
PKC	Proteína Cinasa C
PM	Peso Molecular
PML	Proteína de leucemia promonocítica
PRE	Elemento de Respuesta a progesterona
PVs	Papilomavirus
RT-PCR	Transcripción Reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleótido
SOC	Medio de cultivo enriquecido
Sp1	Proteína estimulante 1
T	Timina
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TF IID	Complejo de factores de transcripción II D
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPH-AR	Virus de Papiloma Humano de Alto Riesgo
YY1	Proteína Ying Yang 1

RESUMEN

La infección con virus de papiloma humano tipo 16 y 18 constituye el factor de riesgo más importante para el desarrollo de cáncer cervicouterino (CaCU). El VPH-16 también se encuentra en aproximadamente el 20% de los casos de cáncer bucal (CB), pero su asociación con la carcinogénesis en este tipo de cáncer no es concluyente. Reportes sobre metilación de DNA en VPH-16 de zonas anogenitales encontraron hipermetilación en el extremo 3' del gen L1 y en parte de la región larga de control (LCR) en lesiones de alto grado y carcinomas, e hipometilación en infecciones asintomáticas y lesiones de bajo grado. **Objetivo:** Se analizó la frecuencia de metilación del gen L1 y LCR del VPH-16 en pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad bucal (CECB) y controles sanos, y se determinó su asociación con la carcinogénesis. **Metodología:** Muestras con CECB y controles sanos se tipificaron con oligos universales y específicos para VPH-16. Se analizó el estado de metilación de 12 muestras con CECB y cuatro controles sanos VPH-16 positivos. El DNA se modificó con bisulfito de sodio y las regiones de la LCR, el gen L1 y parte de L2 se amplificaron por PCR con 7 juegos de oligos. Cada región amplificada se clonó con el sistema TOPO TA y se secuenciaron diez clonas de cada paciente. **Resultados:** En este estudio se encontró hipermetilación en la región 3' del gen L1 y LCR de VPH-16 en diez de doce (83%) biopsias de CECB. Sin embargo, en los controles sanos esta zona no se observó metilación en ninguno de los sitios analizados. También se analizó el estado de metilación de la región del *splicing* del gen L2/L1, encontrándose hipermetilación consistente y homogénea en cuatro de once (33%) carcinomas. Sin embargo, el significado y el mecanismo de hipermetilación hallada en la zona de *splicing* no ha sido estudiada y no hay reportes a cerca de su importancia funcional en el ciclo viral así como en el proceso carcinogénico. **Conclusiones:** El análisis de los datos revelan que los cambios epigenéticos del VPH-16 en CECB son similares a los reportados en carcinomas de la zona anogenital, lo cual sugiere que el proceso carcinogénico está bajo la influencia del VPH-16 en la mayoría de los carcinomas analizados.

ABSTRACT

Human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection is a significant risk factor for uterine cervical carcinoma. However, the role of HPV-16 infection in oral squamous cell carcinoma (OSCC) is less well defined where this virus is detected in around 20%. A probably causal association is not conclusive yet. The HPV-16 methylation of has been suggested as a biomarker of cervical neoplastic progression, because previous studies of HPV-16 DNA methylation have identified hypermethylation at the 3' L1 gene and 5' of the long control region (LCR) in many malignant lesions, but seldom in asymptomatic infections and low-grade precancerous lesions.

Objective: To evaluate the frequency in the methylation patterns inside of L1 gene and LCR region of HPV-16 from OSCC and normal oral mucosa, and to determine its relationship with the progression OSCC. **Methods:** The clinical samples were confirmed to be HPV positive for PCR using MY primers and to confirm HPV type 16 for using specific primers. To establish the methylation patterns, bisulfite modification was done, then PCR amplification with seven specific primers which span the L1 and LCR, after that each every one amplicons was cloned into the TOPO TA vector. Finally ten clones of amplicon were sequenced and analyzed.

Results: We found hypermethylation of the 3' end L1 gene and LCR of HPV-16 in ten out of twelve (83%) HPV-16 positive OSCC, however, four normal oral mucosa tissues were not methylated in any analyzed site. In order to know if the methylation is consistently with the remainder L1 gene, we analyzed the methylation patterns in the splicing site between L1 and L2 genes, identifying heavy hypermethylation in four out of eleven samples; the observed methylation was more homogeneous and consistently than the other analyzed sites. The functional relevance of these processes has not been studied yet either in the functional importance life cycle viral and the carcinogenic process. **Conclusions:** These results indicate that epigenetic changes of HPV-16 in OSCC are similar to those in anogenital carcinomas, suggesting that HPV-16 has an influence in the carcinogenic processes in most if not all of these oral malignant lesions.

Capítulo I

Introducción

1.1 El Cáncer de la Cavidad Bucal

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de las células, que puede progresar a formas con capacidad de invasión de tejido local y metástasis sistémicas, lo cual resulta de mutaciones que producen un desequilibrio entre la división celular y la apoptosis.⁶⁸ Es claro que la transformación celular resulta de alteraciones genéticas y en años recientes se ha establecido que también va acompañada de alteraciones epigenéticas en genes que regulan la homeostasis celular, y la infección con cierto tipo de virus favorecen el proceso carcinogénico.¹¹⁹ El Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECC) comprende diferentes sitios anatómicos: la cavidad bucal, la faringe, la laringe y los senos paranasales. El cáncer de la cavidad bucal (CB) compromete al tejido de los labios, la mucosa bucal, las encías, la gíngiva retromolar, al piso de la boca, al paladar duro y a la lengua.¹⁴⁹ Aproximadamente el 90% de los CB son carcinomas epidermoides de la cavidad bucal (CECB) ó carcinomas de células escamosas los cuales generalmente son malignos y tienden a diseminarse rápidamente.^{18,149}

De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (por sus siglas en inglés *IARC*), en el año 2002 a nivel global, se diagnosticaron 274,289 nuevos casos de CB, la mortalidad reportada ese año fue de 127,459.¹⁴⁷ El CB es el sexto cáncer más prevalente a nivel mundial; el tercero en países desarrollados y el octavo en los países subdesarrollados, siendo en India la mayor prevalencia. En México la incidencia de CB en el 2002 fue de 1642 casos, de los cuales 550 fueron decesos.¹⁴⁷

El Instituto Nacional de Cancerología (INCan) centro de referencia para pacientes con cáncer, en el periodo de 1985 a 1992 atendió 13 060 pacientes; de los cuales, 633 (5%) fueron pacientes con neoplasias de la CB, y de esos 387 (61.1%) fueron de sexo masculino y 246 (38.9%) de sexo femenino.⁹⁵

1.1.1 Características clínicas del carcinoma epidermoide de la cavidad bucal

El CECB presenta una gran diversidad de formas, sin embargo, las lesiones en su etapa más temprana son asintomáticas. Las lesiones premalignas y malignas más tempranas se pueden presentar como placas rojas o blancas indoloras. Sin embargo, las placas blancas o leucoplasia son de mejor pronóstico que las rojas también conocidas como eritroplasia. La eritroplasia cuando presenta características moteadas en la examinación macróscopica generalmente son displasias severas cuando se examinan histológicamente. Lesiones de malignidad intermedia pueden presentar una ulceración persistente con nódulos linfáticos e infiltración al tejido adyacente. Algunas lesiones malignas son pequeñas úlceras indoloras y muchas revierten si se detiene el consumo de tabaco. Los estadios tardíos son úlceras grandes, induradas y con márgenes enrollados con destrucción ósea, que remueven el diente ó inducen fracturas patológicas con dolor, entumecimiento o parestecia.^{18,108,149}

Las lesiones presursoras del CECB presentan alteraciones en la mucosa con cambios displásicos que se detectan histológicamente. Sin embargo, un proceso maligno puede presentarse directamente *de novo* sin ningún cambio previo detectable en la mucosa y sin síntomas previos hasta la etapa tardía, por ese motivo el CECB se diagnostica tardíamente. El promedio de sobrevivencia es del 30-40% por cinco años. Por lo tanto la mortalidad es alta y el pronóstico pobre.^{18,149}

1.1. 2 Factores de riesgo para el cáncer bucal

El CB es una enfermedad multifactorial debida a factores ambientales como propios del huésped, dentro de los factores ambientales está el consumo de tabaco y alcohol que son los principales factores de riesgo.⁶⁴⁻⁸⁹ El tabaco y el alcohol son carcinógenos que directa o indirectamente generan daño al DNA, el cual si no es reparado puede originar mutaciones, alteraciones en la regulación del ciclo celular y apoptosis.^{53, 62,64} El riesgo es dosis dependiente y el consumo de

ambos incrementa el riesgo en forma importante, explicando al menos del 75 al 85% de los casos.⁶⁴⁻⁸⁹

Sin embargo, alrededor del 15 al 20% de casos con CECB ocurre en personas no expuestas a tabaco y alcohol.^{45,78,142} Y varios estudios han propuesto al virus de papiloma humano (VPH) como posible co factor y/o agente causal en el desarrollo de algunos casos de CECB.^{46,47,59,89,126}

Existen factores de riesgo adicionales como, antecedentes de cáncer familiar, deficiencias nutricionales, posición socioeconómica baja, pobre higiene bucal, uso de enjuagues bucales, edad y género pero su papel en la carcinogénesis no es concluyente.⁹

1.2 Los virus de papiloma humano y cáncer

La estructura y composición de los papilomavirus (PVs) se demostró mediante microscopía electrónica por *Strauss* en 1949.¹²⁰ *Crawford* y *Crawford* en 1963 describieron la primera caracterización del DNA viral en su forma súper enrollada, circular y lineal.²⁴ Pero no fue hasta 1974 y 1976, que *zur Hausen* postuló y analizó el posible papel del VPH en Cáncer Cervicouterino (CaCU).^{154,155}

Los primeros tipos de VPH aislados fueron de biopsias con CaCU, posteriormente se demostró la heterogeneidad de la familia de PVs por el aislamiento de tipos específicos de diferentes sitios anatómicos; como cérvix, verrugas genitales, verrugas plantares y papilomas laríngeos.⁴⁹

La infección con VPH de alto riesgo (VPH-AR) como el tipo 16 y 18 es un paso necesario pero no suficiente en la etiología del CaCU y cáncer de la región anal.⁶³ Ya que estudios epidemiológicos reportan que las infecciones por VPHs se resuelven por el huésped en un 30-60%, pero el 1% evoluciona a CaCU invasivo. Sin embargo, hay un incremento de progresión carcinogénica en infecciones con VPH-AR, ya que la presencia de VPH-AR en el 99.9% de todos los CaCU, así como la expresión de los oncogenes virales E6 y E7, indispensables para

mantener el fenotipo transformado y la integración del virus al genoma de la célula hospedera es constante en lesiones de alto grado y carcinomas.^{36,87,97,98}

Se ha propuesto también que el VPH-16 pudiera tener una posible asociación causal con el desarrollo de carcinoma de células escamosas de las amígdalas, ya que epidemiológicamente se ha reportado que alrededor del 50 a 58% de este tipo de carcinomas contienen VPH y el tipo más frecuentemente encontrado es el tipo 16.^{48,125} se ha demostrado también que en los tumores VPH positivos hay expresión de los oncogenes E6 y E7¹⁴³, así como integración viral.¹² Y desde 1983 *Syrjänen K* y *Syrjänen S* sugirieron por vez primera al VPH como posible factor etiológico de un pequeño grupo de CECB,¹²⁴ a partir de entonces, una gran diversidad de estudios epidemiológicos y moleculares han sugerido una probable asociación causal de VPH con un subgrupo de CECB.^{46,52,78,107}

1.2.1 Virus de papiloma humano y cáncer de la cavidad bucal

Actualmente al VPH-16 se le relaciona con el CECB, la boca es en el plano celular de estructura muy semejante a la vagina y el cuello de útero. Ambos órganos tienen el mismo tipo de epitelio escamoso estratificado que son el objetivo de VPH-16, así como el receptor alfa 6 beta 4 integrina el cual se cree es el receptor putativo de VPH³⁷ y los factores celulares que favorecen la replicación viral. Todos estos datos apuntan que la producción de viriones de VPH en cavidad bucal sea exitosa, lo cual ya se ha confirmado.⁹² La mayor parte de los cánceres bucales son cánceres de células epiteliales, sobre todo carcinomas de células escamosas o CECB, situación no distinta a los cánceres que afectan el cuello uterino. El primer paso en la comprensión de las similitudes de estos tejidos y la enfermedad que los afecta, derivó de investigaciones que pudieron relacionar el CECB con el VPH. Un estudio realizado por *Maura Gillison* y cols auspició la premisa de que el VPH se relaciona con ciertos tipos de cáncer oral, en el cual el 25% de los tumores fue positivo para VPH y el 90% de éstos exhibieron la presencia de VPH-16.^{45,47}

A partir de entonces diversos estudios epidemiológicos con CECB, han reportado que el VPH-16 es frecuentemente encontrado en algunos carcinomas de esta región,^{8,126} tal como lo muestra un estudio realizado en pacientes que acuden al INCan.⁶⁵ Un estudio de meta-análisis que incluyó 94 informes de CECB, mostró que la frecuencia de detectar VPH incrementa en displasia bucal (2-3 veces) y carcinomas (4.7 veces) en comparación con tejido normal de mucosa bucal, y la probabilidad de detectar VPH-AR que VPH de bajo riesgo es 2.8 veces. Este reporte proporciona evidencia cuantitativa de que la infección de la mucosa bucal con VPH-AR, es un factor de riesgo independiente para CECB.⁹³

El consumo de tabaco y alcohol promueve la invasión por VPH, la combinación de éstos en la boca pudiera generar la formula para producir un CECB.⁴⁶ Aunque la presencia de VPH en cavidad bucal se asocia con un riesgo mayor de desarrollar CECB y de la orofaringe, independientemente de la exposición al tabaco y alcohol,⁴⁶ Como lo reporta un estudio realizado en el INCan, en donde el 78.4% de las mujeres y el 10.8% de los hombres no consumían tabaco.⁹⁵ Y los individuos infectados con VPH el riesgo de desarrollar cáncer es mayor que en los individuos expuestos a tabaco o alcohol, pero sin exposición al VPH.⁴⁶

La frecuencia de VPH-AR en CECB y cáncer de orofaringe se presenta en pacientes jóvenes no expuestos a tabaco y alcohol, y su transmisión se asocia con prácticas sexuales. El riesgo es mayor en hombres cuyas compañeras sexuales referían historia de displasia en cuello uterino.¹¹⁷ Sin embargo, la frecuencia de VPH en pacientes jóvenes y mayores de 50 años no es significativamente diferente, lo que sugiere un papel similar del VPH en todos los grupos de edad.¹¹⁶

Esta información ayuda a confirmar un nexo firme entre VPH y CECB; además, los pacientes con CECB VPH positivos tienen mejor pronóstico de sobrevivencia que los negativos a VPH.⁴⁵ Por otro lado, los tumores VPH positivos tienen distinto perfil molecular,⁸⁸ clínico y patológico que los VPH negativos. El perfil molecular de las neoplasias VPH positivas se asocia con integración del

virus, p53 silvestre y sobreexpresión de p16. Histológicamente los CECB positivos a VPH son carcinomas pobremente diferenciados, de apariencia basaloide.

Con respecto a los estudios moleculares, la demostración de expresión de los transcritos de los oncogenes virales E6 y E7, ^{125,143} así como la integración viral al genoma del hospedero en CECB, ⁸⁻⁵² son propiedades que apoyan el proceso oncogénico bajo la influencia de VPH-AR. Estos datos sugieren que la infección con VPH-AR desempeña una función importante en la etiología de un subgrupo de CECB. Además, se ha reportado que el virus y los transcritos de E6 y E7 se localizan en el tumor primario y sus sitios de metástasis ¹³⁵ en un número de copias similares a las reportadas en cánceres asociados a VPH, como el CaCU. ^{92,77,60} La serorreactividad contra proteínas de la cápside viral y oncogenes también se ha asociado con un incremento en el riesgo de cáncer en la cavidad oral. ⁵⁹

Sin embargo, la causalidad de VPH y la carcinogénesis en CECB no es concluyente, como en el caso de CaCU. Existe un tipo de cáncer de cabeza y cuello; el carcinoma de células escamosas de amígdalas donde se acepta que el VPH-AR es el factor etiológico de al menos el 50% de los casos, ya que la frecuencia del virus excede el 50% y el tipo 16 el más frecuente al igual que en CaCU. ¹⁴³⁻¹²⁵ Esta evidencia se apoya por un estudio de casos y controles coordinado por la IARC, en la que concluyó que el VPH tiene un papel etiológico en muchos tipos de cáncer de la orofaringe y posiblemente en un pequeño grupo de CECB. ⁵⁹ Pero debido a la baja frecuencia del VPH en CECB se necesita más evidencia epidemiológica y molecular para determinar la función del VPH en el desarrollo de este tipo de cáncer. Los VPH-AR poseen dos oncoproteínas para mantener el fenotipo celular transformado durante la carcinogénesis, las cuales se sobreexpresan por un incremento en la transcripción viral.

La transcripción del virus se modula por diversos factores transcripcionales, un mecanismo adicional de regulación de la transcripción es la metilación de DNA, ya que es importante para mantener la homeostasis celular y el desequilibrio en ésta se ha asociado con la carcinogénesis.

1.3 Taxonomía y morfología de los papilomavirus

Los papilomavirus (PVs) son virus de DNA que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son virus pequeños de 52 a 55 nm de diámetro de forma icosaédrica, sin envoltura lipídica y no líticos.^{30,61} Tienen una cápside de 72 capsómeros constituido por las proteínas L1 y L2; los viriones son relativamente estables y permanecen infecciosos en un ambiente húmedo por meses. Infectan humanos y una gran variedad de animales, son epiteliotrópicos y específicos de especie. Pueden infectar epitelio de piel y mucosa o ambas como la boca, la faringe, la lengua, las amígdalas, la vagina, el pene y el ano. El VPH tipo 16 infecta mucosas, pertenece a la especie 9 del género alfa-papilomavirus y es el tipo más comúnmente encontrado en CaCU, cáncer de la región anogenital, cáncer de amígdalas y CECB.

Hasta la fecha, estos virus no han podido ser aislados en cultivo celular; sin embargo, las técnicas de biología molecular han permitido grandes progresos en su caracterización.

1.3.1 El genoma de los papilomavirus

Todos los PVs tienen una organización genómica similar, son virus de DNA de doble cadena circular de aproximadamente 8 kb que se empaqueta en nucleosomas asociado a histonas celulares en forma de cromatina.¹²¹ El genoma se divide en 3 regiones: la región temprana (E), la región tardía (L), y la región larga de control (LCR), la cual contiene varios elementos de respuesta en *cis* que modulan la transcripción de los genes tempranos. El DNA se transcribe en forma unidireccional a partir de un promotor temprano (p97) y un promotor tardío (p670), dependiente del proceso de diferenciación epitelial, produciéndose transcritos policistronicos que se procesan por *splicing* diferencial.¹⁵³ (Figura 1)

- 1) La región “E” ocupa el 50% del genoma viral y codifica para seis proteínas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) no estructurales con función reguladora,

involucradas en la replicación y transformación celular que se expresan en células indiferenciadas e intermedias del epitelio escamoso.¹³

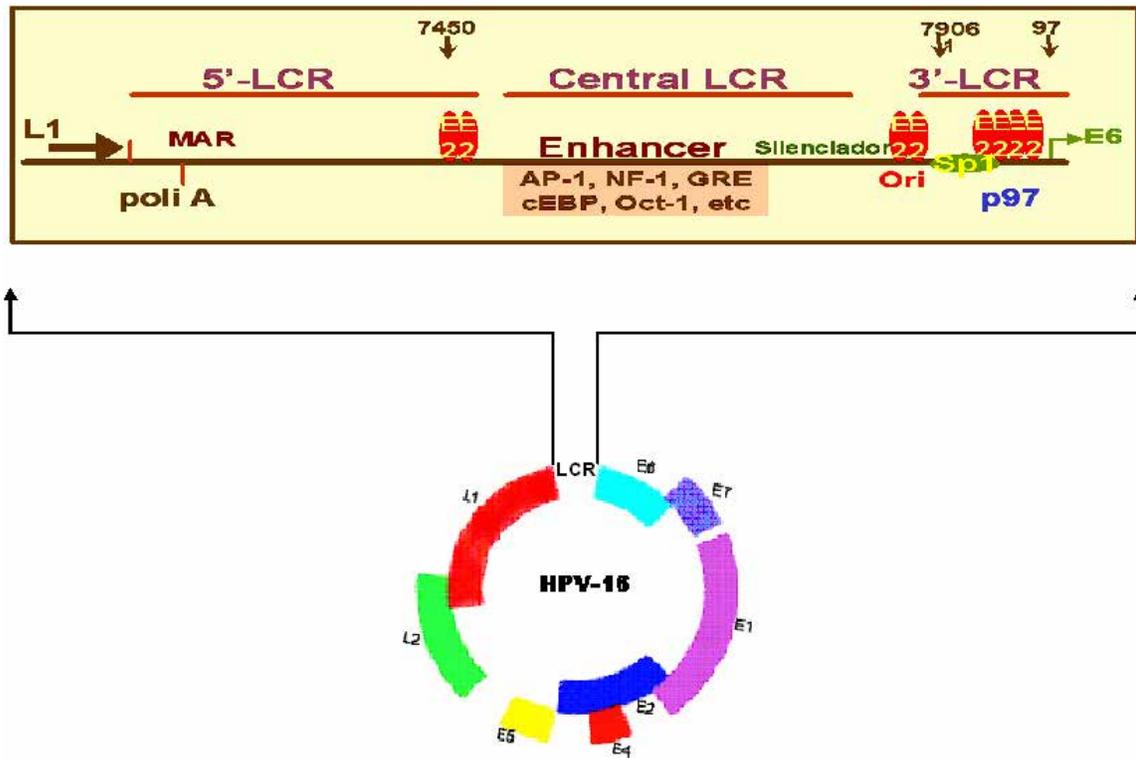


Figura 1. Organización genómica de VPH-16 y los elementos de la LCR

El genoma de DNA de VPH-16 contiene 7906 pb, codifica para ocho proteínas (E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2 y L1) que se expresan diferencialmente. Contiene además una región larga de control "LCR" (parte superior de la figura), en la cual se localiza el promotor "p97", el silenciador, el *enhancer* y en el extremo 5' una cola de poliA y una secuencia MAR. La LCR posee diversos elementos de respuesta en *cis* celulares que modulan la transcripción viral, y cuatro sitios de unión para la proteína viral E2, la cual modula la transcripción y replicación viral. Modificado de <http://www.bioscience.org/2002/v7/d/munger/figures.htm>.

- 2) La región "L" comprende el 40% del genoma viral y la expresión de sus genes marca el inicio de los eventos tardíos para que se complete el ciclo de vida del virus. Codifica para dos proteínas estructurales L1 y L2, y su expresión está restringida a una parte del epitelio en diferenciación, donde también ocurre la replicación del DNA viral.¹³

- 3) La región larga de control o LCR es una región de alrededor de 850 pb (10% del genoma viral) que no codifica para proteína alguna y está ubicada entre los genes L1 y E6. Contiene al promotor central p97, el origen de replicación viral, un elemento silenciador, y un potenciador o *enhancer* que regulan la transcripción de los oncogenes E6 y E7 (Figura 1). Posee además una cola de poliadenilación y está flanqueada por dos secuencias de unión a la matriz nuclear (por sus siglas en inglés MAR) en el extremo 5' y 3'.¹³

1.3.2 Mecanismos de infección viral

La patogénesis viral comprende diferentes procesos por los que los virus causan enfermedad, como el mecanismo de entrada del virus, la replicación viral, la respuesta del sistema inmune, la diseminación viral y el daño celular.

Para infectar a su hospedero, el virus primero debe infectar a células susceptibles y permisivas; la susceptibilidad se refiere a la presencia de receptores celulares que reconozcan el virus; y la permisividad a la capacidad celular de favorecer la replicación viral. El sitio de expresión del receptor es determinante para la infección, si el receptor sólo se expresa en la membrana de células basales de epitelios polarizados, el virus no puede infectar a menos que atraviese el epitelio. Otro factor que favorece la infección son las secuencias virales; como los potenciadores o *enhancers* de algunos virus que sólo se activan en tejidos específicos; tal como el *enhancer* de PVs. Todos estos factores determinan el tropismo de algunos virus por cierto tipo de tejido.

La infección viral inicia cuando el virus es reconocido por un receptor celular específico, algunos virus necesitan además de un correceptor. El receptor se puede localizar en la membrana apical o basolateral de células epiteliales o endoteliales. Sí el virus se une a la membrana apical y posteriormente una vez replicado se libera por la misma, puede causar una infección localizada, el requisito es que no atraviese el epitelio o endotelio. En otros casos, los viriones recién replicados pueden diseminarse del sitio primario de infección a otros tejidos atravesando el epitelio o endotelio al unirse a la membrana basolateral.

Los receptores de algunos virus son componentes de la matriz extracelular, como las proteínas de adhesión celular (fibronectinas y proteoglicanos) y proteínas de membrana como las integrinas. La infección viral inicia por la probabilidad de colisión entre el virus y la célula, de tal forma que la alta concentración de virus incrementa la probabilidad de infección; sin embargo, el virus debe encontrar el receptor celular específico que lo reconozca y permita la internalización del genoma viral para su posterior replicación.⁴¹

1.3.3 Ciclo productivo y replicación de los papilomavirus

Los PVs se replican en epitelios en proceso de diferenciación terminal de piel y mucosas. Sin embargo, la infección viral tiene lugar en las células basales, debido a eso no hay un sistema eficiente para propagarlos en cultivo celular. La búsqueda del receptor de los PVs se ha estudiado en modelos de infección *in vitro*; los cuales sugieren que la interacción inicial es mediada por un receptor primario de baja especificidad como el proteoglicano de heparán sulfato¹¹² que concentra al virus alrededor de un segundo receptor más específico la proteína alfa 6 beta 4 integrina,³⁷ que favorece la infección viral, y al cual se le ha propuesto como el receptor probable de PVs. También se ha propuesto que la laminina 5 pudiera ser un transreceptor extracelular que se une transitoriamente al virus y posteriormente se une a alfa 6 beta 4 integrina en células basales.²⁶ Por otro lado, se ha demostrado que la alfa 6 beta 4 integrina no se requiere para la unión de VLPs (por sus siglas en inglés partículas virales parecidas a virus), de VPH-16 y VPH-11 en keratinocitos cultivados *in vitro*,¹¹² tampoco es necesaria para pseudoviriones de BPV4¹¹⁵ y VPH-33,¹⁴⁰ el heparán sulfato tampoco es necesario para la infección de VPH-31, sugiriendo que los PVs pueden utilizar otros receptores. Debido a esta controversia, es difícil distinguir al receptor que capta a PVs en la infección *in vivo*.

Una vez que el VPH es reconocido por su receptor e internalizado en la célula basal, diversos factores celulares interactúan con la LCR para mantener la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7 a bajos niveles.^{13,44} Cuando la célula basal entra al proceso de diferenciación terminal, el virus puede completar

su ciclo productivo (Figura 2), que comienza con la expresión de los oncogenes E6 y E7 en las células parabasales, las oncoproteínas dirigen a las células a entrar en la fase S, favoreciendo la replicación viral que tiene lugar cuando las proteínas virales E1 y E2 se producen. La proteína E1 que es la responsable de la replicación del viral, es una helicasa dependiente de ATP que une a un palíndromo de 18 pb rico en AT en el origen de replicación (ori) ubicado en la LCR (Figura 6) La unión de E1 al DNA depende de su acomplejamiento con la proteína viral E2, las interacciones E1-E2 hacen que E2 atraiga otras moléculas de E1 al origen de replicación. Esta unión causa una curvatura en el DNA para el correcto ensamblaje del complejo de iniciación de la replicación y la apertura de la doble hélice, finalmente E2 es desplazada por una reacción dependiente de ATP.¹⁴⁶ En ese momento la replicación del genoma viral tiene lugar.

A partir de entonces empieza la expresión de las proteínas tardías como E1^{E4}, L2 y L1. La proteína E1^{E4} es producto de un proceso de *splicing* que es abundante durante el ciclo viral y se le considera de expresión tardía. Se localiza en los filamentos intermedios de citoqueratinas y causa el colapso de éstas para la liberación de los viriones,³⁴ su expresión precede la síntesis de las proteínas estructurales L1 y L2, las cuales se transcriben a partir del promotor tardío p670 en VPH-16, lo cual ocurre en las células de diferenciación terminal. La proteína L1 conforma el 80% de la cápside y se expresa después de L2. La cápside contiene 360 copias de L1 y aproximadamente 12 copias de L2, organizadas en 72 capsómeros de una partícula icosaédrica. La proteína L2 se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios *PML* (proteína de leucemia promonocítica) y recluta a L1 a estos dominios.²⁹ Se ha sugerido que estos *PML* son el sitio de la replicación viral y que las proteínas de la cápside se acumulan en este sitio para facilitar el empaquetamiento del genoma viral. Para que el virus sea infeccioso se debe liberar de la célula y sobrevivir extracelularmente antes de infectar otras células epiteliales. Los PVs son virus no líticos ya que se liberan hasta que la célula ha alcanzado la superficie del epitelio.

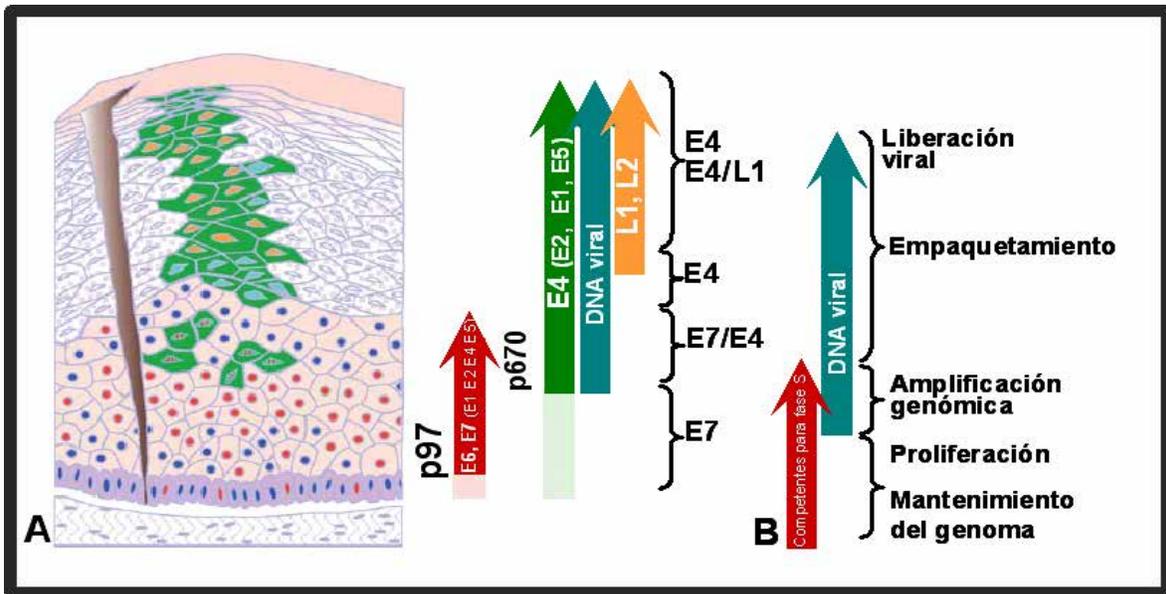


Figura 2. Patrones de expresión viral durante el ciclo productivo de VPH-16

La infección viral ocurre en la célula basal, donde el virus se establece y replica a bajos niveles (círculo rojo). En la capa suprabasal empieza la transcripción de los oncogenes necesarios para inducir a la célula a entrar en la fase S, la expresión de éstos está bajo el control del p97 (flecha roja), a posteriormente se expresan los genes tradíos que están bajo el control de p670. El DNA viral se replica (flecha verde) y las proteínas de la cápside se sintetizan, se forman y liberan los visiones (flecha naranja). (Tomado de Doorbar J, 2005).³⁴

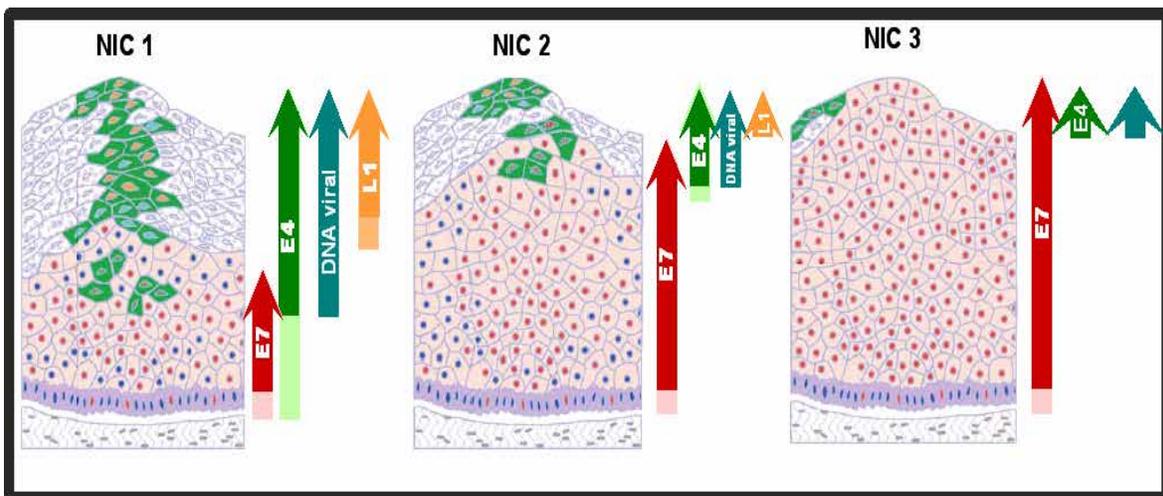


Figura 3. Alteraciones en los patrones de expresión viral durante la carcinogénesis

En la progresión carcinogénica, la regulación del ciclo de vida viral se pierde. En NIC 1 el ciclo es casi normal, hay expresión de partículas virales. En NIC2 y NIC3, el orden de eventos del ciclo de vida cambia, ya que hay una expresión aumentada de E7 y una fase proliferativa más extensa. (Tomado de Doorbar J, 2005).³⁴

1.3.4 Patrón de transcripción viral durante la carcinogénesis

Los patrones de transcripción viral cambian en las diferentes capas del epitelio infectado durante el ciclo viral, así como en los diferentes grados de lesiones epiteliales, ya sean benignas, premalignas o cancerosas. La temporalidad de estos eventos varía y depende de la severidad de la neoplasia. El virus puede permanecer latente y producir una infección abortiva, sin la producción de viriones y si la infección persiste puede predisponer a lesiones de bajo grado y éstas pueden progresar a cáncer. En neoplasia intracervical grado 1 (por sus siglas en inglés *NIC*) el patrón de expresión es semejante a una infección productiva, en la de grado 2 y 3 (*NIC2*, *NIC3*) hay una fase proliferativa más extensa (Figura 3), en donde la producción del virus es muy pobre. El patrón de expresión de los oncogenes es desde moderado en lesiones de bajo grado en las dos terceras más profundas del epitelio hasta intenso en lesiones de alto grado y CaCU a través de todo el epitelio indiferenciado.³⁴

El evento clave en la progresión de una lesión productiva a una neoplasia de alto grado es el aumento transcripcional y sobreexpresión constante de las oncoproteínas necesarias por su actividad transformante.^{87,97} Un factor que ayuda a perder el control transcripcional de los oncogenes es la integración del virus al genoma celular, lo cual ocurre normalmente por delección del gen E2. La consecuencia de perder su expresión es grave debido a que E2 ejerce una función represora sobre el promotor de los oncogenes.^{67,74} Por lo tanto, la retención de los oncogenes y la pérdida de E2, usualmente acompaña el desarrollo de un cáncer invasivo.^{34,67,74}

Sin embargo, el aumento transcripcional de los oncogenes ocurre no solo por pérdida de E2, si no también por delecciones o mutaciones en los sitios de unión a silenciadores transcripcionales como YY1, la mutación o delección inhibe la unión del factor de transcripción y por lo tanto incrementa la expresión de los oncogenes.

1.3.5 Procesos oncogénicos de los VPH, la función de las oncoproteínas

Los VPH-AR favorecen la carcinogénesis por acción de sus oncoproteínas E6 y E7,^{87,97} ya que interactúan e inactivan reguladores negativos del ciclo celular como p53 y Rb, respectivamente. Alteran el control del ciclo celular, la reparación del daño al DNA e inhiben la apoptosis,³⁵ promueven la replicación viral en células indiferenciadas al dirigir las a entrar a la fase S. Esto último se debe a que E7 se comporta como un “mitógeno” al inducir el crecimiento celular, ya que E7 secuestra a Rb, la cual a su vez libera a E2F, entonces E2F libre promueve la transcripción de genes celulares necesarios para entrar a la fase S y reanudar el ciclo celular.³⁵ En la fase G1 que es la fase no replicativa del ciclo celular, Rb se asocia y reprime al factor de transcripción E2F.

Por otro lado, E6 inhibe la apoptosis y la reparación de daño al DNA, por que induce la degradación de p53. La ausencia de p53 promueve un estado de división celular constante,⁸² permitiendo la sobrevivencia celular y facilita que el virus complete su ciclo vital. Sin embargo, para la inmortalización celular es importante la acción de la enzima telomerasa y E6 incrementa la actividad de las telomerasas, previniendo el acortamiento de los telómeros durante la replicación celular.³⁵

La proteína E5 tiene una ligera actividad transformante, actúa como “mitógeno” en fibroblastos y en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), además activa el receptor de EGF sin ligando, induce proliferación de células epiteliales. También regula positivamente el promotor de *c-Fos*, *c-jun* y *junB*. Es una proteína de membrana, de naturaleza hidrofóbica que se halla principalmente en el retículo endoplásmico, Golgi y membrana plasmática,³⁵ E5 también secuestra la expresión de *MHC-I*.

La regulación transcripcional de los oncogenes está bajo el control de la LCR, (Figura 1). Funcionalmente se divide en un dominio de respuesta a E2, regulado por la proteína viral E2 y donde se localizan el origen de replicación viral y el promotor temprano (p97), un segundo dominio celular donde se localiza el potenciador o *enhancer* transcripcional (Figura 4).^{13,44}

1.3.6 La proteína viral E2 modula la transcripción y replicación viral

La proteína viral E2 es de naturaleza nuclear, posee un dominio de activación que regula la transcripción y replicación viral, un dominio de dimerización para ser funcionalmente activa y un dominio de unión al DNA cuya secuencia es un palíndromo de 12 pb (ACCGNNNNcGGT). El cual debe permanecer no metilado en sus sitios CpG para el reconocimiento de E2 a su secuencia consenso, ya que la metilación de estos CpG inhibe su unión.¹³⁰ La unión de E2 a la LCR regula positiva y negativamente la transcripción, así como la replicación viral, estas funciones dependen de la concentración intracelular así como del sitio al cual se une.^{44,90}

Existen cuatro sitios de unión a E2 en la LCR de los VPH-AR (Figura 4), que se enumeran de 3' a 5'.

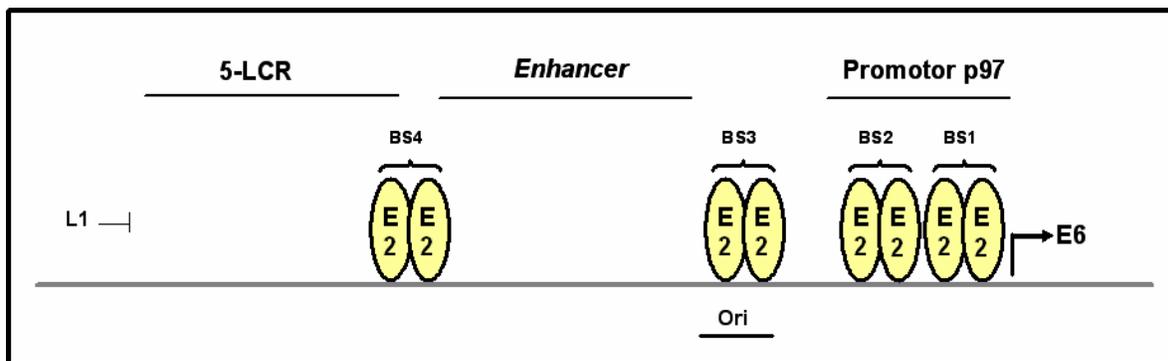


Figura 4. Elementos de respuesta en *cis* para la proteína viral E2 en la LCR de VPH-16

Se muestran los cuatro sitios de unión para la proteína dimérica viral E2, de derecha a izquierda se observa en el promotor dos sitios de unión a E2 que lo reprimen en distintos niveles (BS1, BS2), el tercer sitio se encuentra en el origen de replicación (BS3), y el cuarto sitio se encuentra entre el extremo 5' de la LCR y el *enhancer* (BS4), el cual activa la transcripción.

La unión al sitio cuatro (BS4), su sitio más afín activa la transcripción.¹³ la unión al sitio tres (BS3) favorece la replicación viral.²² La unión al promotor reprime la transcripción gradualmente;⁴⁴ la unión al sitio dos (BS2) reduce la actividad del promotor por competencia con el activador transcripcional *Sp1*,¹²⁷ la unión al sitio uno (BS1), impide la unión de TBP a la caja TATA y afecta la estabilidad del

complejo de preinicio de la transcripción (por sus siglas en inglés *PIC*) una vez unido *TBP*, y por lo tanto reprime la transcripción en su totalidad¹²⁸

La proteína E2 posee actividad antiproliferativa al reprimir el crecimiento celular e inducir apoptosis debido a la represión transcripcional de los oncogenes, con el consecuente aumento de p53.³¹ La alteración o pérdida de su función sea por delección del gen durante la integración viral en el genoma del hospedero o por mutaciones puntuales, resulta en el pérdida del control transcripcional de los oncogenes.^{13,74, 72}

1.3.7 El promotor p97 de VPH-16

El promotor es la secuencia que rodea el sitio de inicio de la transcripción y es necesario para que inicie la misma, dirige la transcripción de un mRNA policistrónico que codifica para las proteínas tempranas. En VPH-16 el promotor recibe el nombre de p97, y posee cuatro elementos de respuesta en *cis*; un sitio BS1 para E2 que se sobre lapa con la caja TATA a la cual se une el complejo *TFIID*, un sitio de unión para Sp1 que se sobre lapa con el sitio de unión BS2 para E2. El uso alternativo de estos sitios por el respectivo factor de transcripción permite la actividad a múltiples niveles del promotor (Figura 5).^{128,127}

El uso del promotor tiene un mecanismo de retroalimentación negativa, que reduce el uso del mismo a su mínimo durante la diferenciación epitelial por el siguiente mecanismo: en células basales se encuentra esencialmente reprimido ya que el sitio *Sp1* es ocupado por un factor relacionado *Sp3*, el cual no activa a p97.⁴ En células suprabasales p97 se activa por *Sp1* y la maquinaria de transcripción general.¹³ La transcripción genera un mRNA policistrónico para E6, E7 y E2. Al traducirse E2 se une al sitio BS2 en p97 desplazando a *Sp1* disminuyendo la tasa de transcripción,¹²⁷ a altas concentraciones de E2, ésta desplaza a *Sp1* y a continuación a *TFIID* (unión a BS1), reprimiendo totalmente el promotor.¹²⁸ Es decir, el desplazamiento de *Sp1* retiene la función del promotor, pero el desplazamiento de *TFIID* anula la función del mismo (Figura 5).^{13, 127,128}

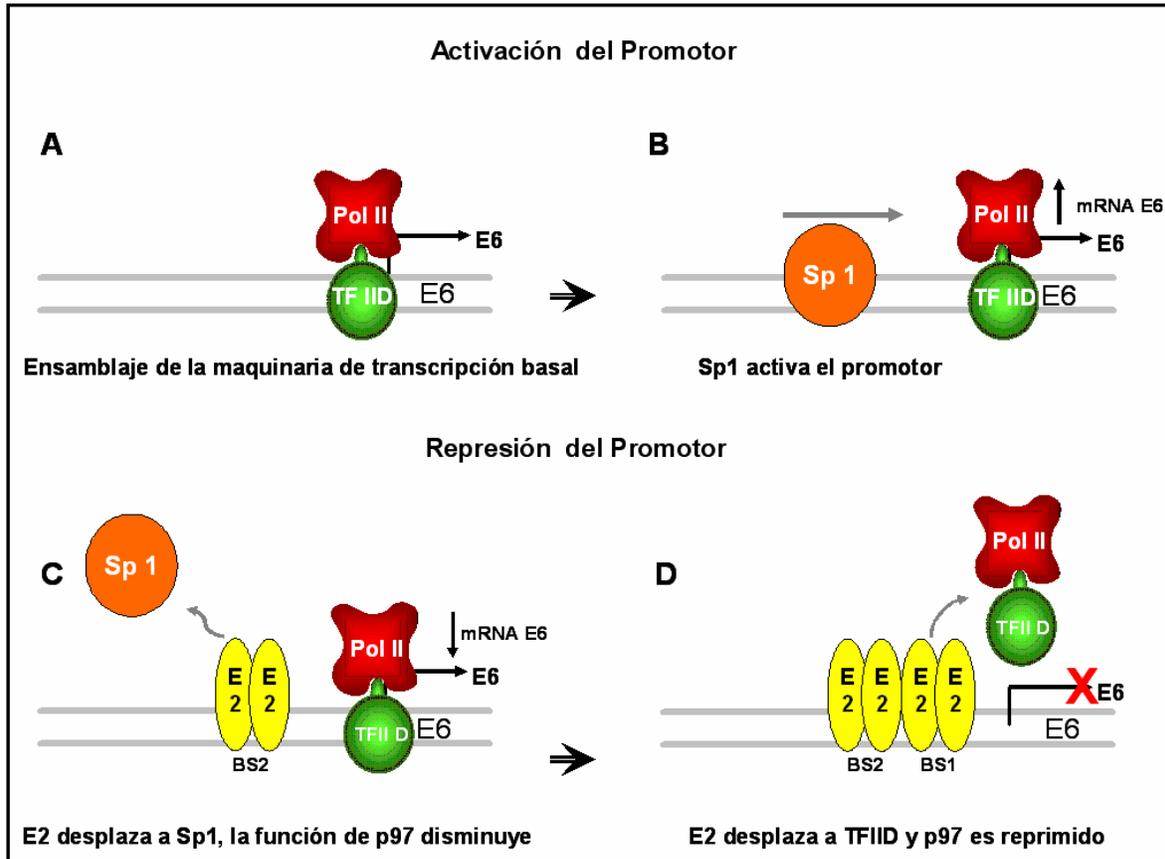


Figura 5. Activación del promotor y el efecto represor de E2 en VPH 16

A) El inicio de la transcripción empieza con la unión de *TFIID* y factores de transcripción general (FTGs) en conjunto con la Pol II. B) Se potencia la transcripción al unirse el factor de transcripción Sp1 a 30 pb río arriba de la caja TATA. Hay dos sitios de unión para el dímero E2 que se localizan entre el sitio de Sp1 y la caja TATA. C) La unión de E2 al sitio más distal (BS2) desplaza a Sp1 disminuyendo la tasa de transcripción de p97. D) La unión de E2 al sitio más próximo a p97 (BS1) desplaza a la maquinaria de transcripción general y reprime al promotor.

Este evento explica que muchas infecciones tengan lugar a nivel subclínico o al curso de una infección latente más que inducir una neoplasia.^{61,90} En lesiones malignas el genoma de VPH se integra al DNA de la célula hospedera, lo cual lleva a la delección del gen E2, por lo tanto se pierde la retroalimentación negativa, con la consecuente expresión constante de los oncogenes, este evento contribuye a la progresión tumoral que culmina con un cáncer más agresivo.

1.3.8 El *enhancer* de VPH-16

El promotor de VPH-16 tiene una actividad basal moderada, para que la transcripción sea activada potencialmente se necesita el estímulo del potenciador o *enhancer*, el cual incrementa la tasa transcripcional hasta 40 veces. El *enhancer* es un segmento de 400 pb ubicado río arriba del promotor y separado 100 pb por el origen de replicación y un silenciador los cuales se encuentran río abajo del *enhancer*.¹³ La fuerza de éste depende del tipo de epitelio infectado y la modulación por estímulos fisiológicos. La especificidad tisular de los papilomavirus reside en este segmento, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. El *enhancer* posee varios elementos de respuesta en *cis* que son reconocidos por una gran variedad de factores de transcripción celulares que regulan la transcripción positiva (Figura 6) y negativamente (Figura 7).

Diversos factores celulares activan el *enhancer*; tal como AP-1, NF-1, TEF, oct-1 y un elemento de respuesta a progesterona (PRE) y glucocorticoides (GRE).^{13,22,50}

1.3.8.1 Reguladores positivos del *enhancer* de VPH-16

AP1: La proteína activadora 1 (por sus siglas en inglés *AP1*), es el principal activador del *enhancer* de VPH-16,⁴⁴ es un factor de transcripción celular que participa en la diferenciación epitelial y regulación de genes tejido-específico. Es un dímero que se compone por miembros de la familia *Jun* y *Fos*, su motivo de unión al DNA es del tipo de cierre de leucinas, las cuales se unen al surco mayor del DNA en una secuencia consenso 5' TGANTCA 3' llamada TRE (por sus siglas en inglés TAP responsive element). El *enhancer* de los VPHs tienen de 1 a 4 sitios de unión a AP-1, en el VPH-16 se encuentran 3 sitios, uno en el extremo 3' del *enhancer* y otros dos en el extremo 5'.¹³⁸

Oct-1: Es un factor que regula diversos genes celulares y virales, es miembro de la familia de factores *PUO*, su secuencia consenso es ATGCAAAT. El VPH-16 tiene

un sitio de unión para *Oct-1* localizado en el extremo 3' del *enhancer* y se ha reportado que es esencial para la actividad del mismo ya que la mutación de ese sitio reduce la actividad transcripcional.¹⁰¹

NF-1: El factor nuclear 1 es un importante activador del *enhancer* que regula la transcripción de muchos genes de señalización celular. Es un dímero cuya secuencia consenso de unión al DNA es 5'TTGGC(N)GCCAA3'. Interactúa con los componentes del *PIC* y con coactivadores como *CBP/p300* y *SRC-1*. En VPH-16 hay siete sitios *NF1* que intervienen en la especificidad por el tejido y potencian la transcripción.³ Por otro lado *NF1* y *Oct-1* pueden formar un heterodímero que une al DNA.¹⁰¹

TEF: Además de *AP-1*, *NF-1* y *Sp1* (en el promotor), *TEF-1* es un cuarto factor implicado en la especificidad por el epitelio con capacidad de activar al *enhancer*. Su secuencia consenso de unión al DNA es 5' GGAATG 3' y se une con mayor afinidad a un sitio doble fijándose como dímero. TEF reconoce siete sitios que se encuentran dentro del *enhancer* de VPH-16 y también reconoce al *enhancer* de Simian virus 40 (por sus siglas en inglés SV40) y al promotor de β -globina humano.^{13,72}

Regulación por esteroides: El *enhancer* de VPH-16 contiene un elemento de respuesta a progesterona (*PRE*) y glucocorticoides (*GRE*), el receptor de estos dos esteroides reconocen la misma secuencia nucleotídica, un palíndromo de 15 pb. Como consecuencia del estímulo por estas hormonas aumenta la expresión de los oncogenes.⁵⁰

1.3.8.2 El regulador negativo del VPH-16

El silenciador es un segmento genómico de 110 pb ubicado entre el *enhancer* y el promotor p97, es una secuencia rica en AT que funciona como origen de replicación y silenciador transcripcional,^{13,72} contiene múltiples sitios de unión para los represores transcripcionales YY1¹⁰² y CDP,¹⁰³

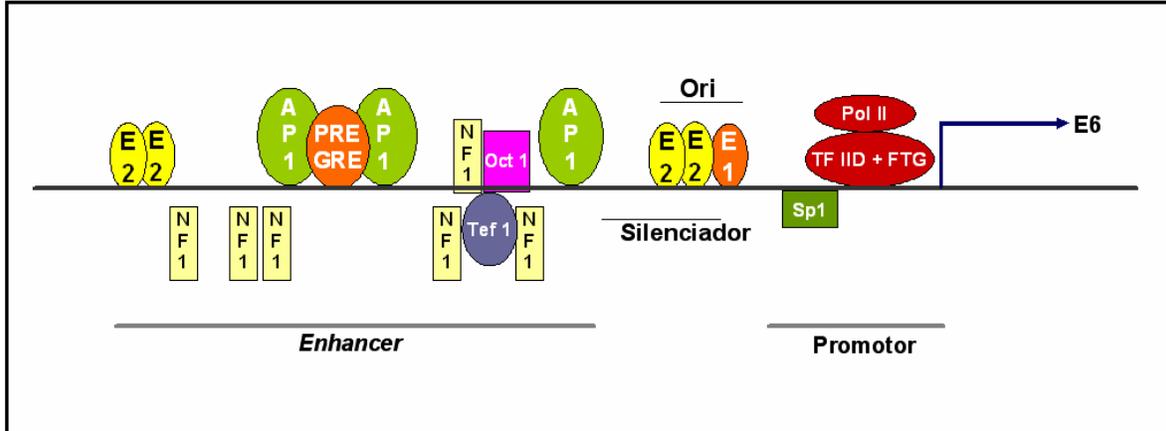


Figura 6. Factores en *trans* que se reconocen y activan la LCR de VPH-16

En la figura se muestra los componentes de la LCR; el promotor, el silenciador, y el *enhancer*. El promotor se activa por Sp1 y los factores de transcripción general. El *enhancer* se activa principalmente por AP1, un sitio para Oct-1 y TEF, el receptor de esteroides (PRE, GRE), seis sitios para NF-1, así como el sitio de E2 (BS4) que activa la transcripción. La unión de E2 en el ori favorece la unión de E1 para que inicié la replicación viral. (Modificado de Bernard HU¹³).

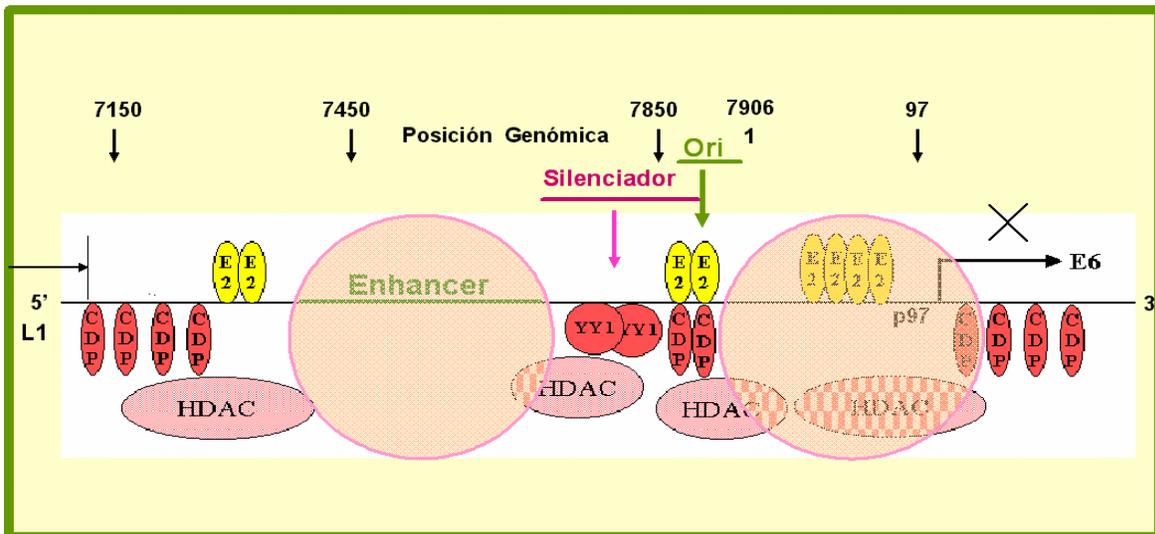


Figura 7. El silenciador y reguladores negativos de la LCR en VPH-16

Se muestra al silenciador que se encuentra entre el *enhancer* y el promotor, el cual reduce la actividad transcripcional en células basales cuando es reconocido por los factores CDP y YY1, éstos al asociarse con HDACs inducen la compactación de la cromatina la cual es refractaria para la transcripción. Se muestran dos nucleosomas, uno sobre el *enhancer* y otro en el promotor (círculos). La secuencia que une ambos nucleosomas es el sitio de unión de los represores YY1 y CDP y del activador AP-1.

El mecanismo represor del silenciador se favorece al asociarse YY1 y CDP con correpresores transcripcionales como las desacetilasas de histonas (*HDACs*), que a su vez atraen otros correpresores y favorecen la compactación de la cromatina, haciéndola refractaria para la transcripcionales (Figura 7).^{102,103}

La expresión génica de VPH-16 se modula positiva y negativamente por la acción del *enhancer* y el silenciador que la activan o reprimen, respectivamente. En las células basales hay una alta concentración de represores transcripcionales como YY1 y CDP, que mantienen la transcripción disminuida, durante la diferenciación celular la concentración de éstos disminuye, mientras que la concentración del activador AP1 se incrementa. Por lo tanto, el silenciador y el *enhancer* funcionan en forma alternada, el silenciador reduce el nivel de expresión génica en células indiferenciadas y el *enhancer* la estimula en las células que están en proceso de diferenciación.⁷²

1.3.9 Organización de nucleosomas en VPH-16

El genoma de VPH al igual que el DNA de las células eucariotas se encuentra organizado en nucleosomas, los cuales se pliegan para formar la cromatina.¹¹⁰ Al nivel de los nucleosomas se regula la expresión génica por cambios conformacionales en respuesta a modificaciones post-traduccionales covalentes de histonas por acetilación, desacetilación y metilación, actividades que son asociadas con activadores y represores específicos de la transcripción. La regulación transcripcional de VPH por cambios en la estructura de la cromatina se determinó al medir la actividad transcripcional en presencia de tricostatina, un inhibidor de *HDACs*.¹⁵² El VPH-16 tiene un nucleosoma en el promotor y otro en el *enhancer* (Figura 7).¹²¹ El silenciador y uno de los sitios AP-1 se encuentran en el sitio de unión de ambos nucleosomas, lo cual permite el acceso a los represores CDP, YY1 y al activador AP-1. El silenciador se asocia con *HDACs* cuando se une YY1 y CDP, y el activador AP1 se asocia con histona acetil transferasas (*HATs*) cuando se une al *enhancer*.^{13,72,102} Es decir, la represión es conferida por el silenciador en células indiferenciadas y la activación en células en diferenciación.¹³

CDP también se une a dos regiones en la matriz nuclear (MAR) flanqueantes con localización en el extremo 5' (o río arriba) de LCR y en el gen E6. Cuando los genomas de VPH se integran al DNA celular, las *MARs* localizadas río abajo de p97, son estimuladores transcripcionales capaces de influenciar muchos otros mecanismos.¹²²

1.4 Metilación del DNA y su posible función en la carcinogénesis

1.4.1 La metilación del DNA es un proceso celular normal

La metilación del DNA es una modificación epigenética que involucra cambios en la estructura del DNA que no afecta la secuencia de bases. Y fue descrita por *Hotchkiss* y *Wyatt* a finales de los 40's y principios de los 50's, respectivamente. En 1970 se propuso como mecanismo de protección contra la integración de DNA extraño, esto se confirmó con la identificación de enzimas de restricción bacterianas. Y no fue hasta 1975 que *Holliday* y *Pugg* propusieron que estaba relacionada con la regulación transcripcional en mamíferos.³²

La metilación de DNA en los eucariotes se da por la adición de un grupo metilo en la posición 5 del anillo de la citosina (C) en los dinucleótidos 5'CpG3', esta reacción es catalizada por una familia de enzimas, llamadas DNA-metiltransferasas (*DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b*), Figura 8. La primera es la responsable del mantenimiento de los patrones de metilación post replicación, y las dos últimas son las responsables de mantener los patrones de metilación *de novo* durante la embriogénesis.⁷⁰

La metilación *de novo* en células somáticas ocurre sólo durante la embriogénesis más temprana, una isla CpG puede marcar a un gen que necesita establecer un estado de cromatina accesible en las etapas más tempranas del desarrollo. Los requisitos para la metilación del DNA en tejido adulto podrían ser mucho menores⁸⁰ y su papel primario es mantener la mayoría de la porción no codificante del genoma en un estado transcripcionalmente inactivo.

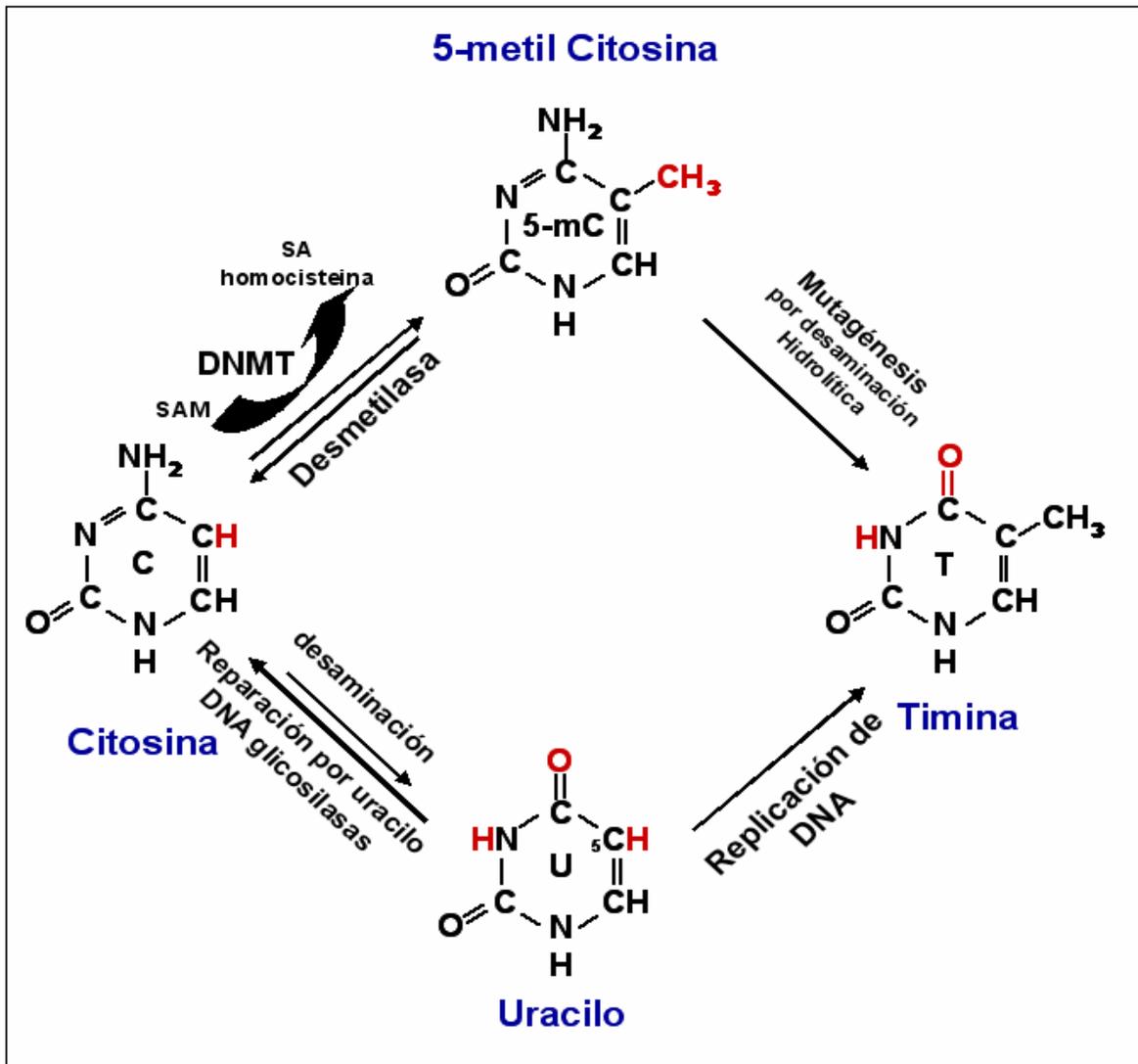


Figura 8. Metabolismo de la citosina

Se muestra las diferentes rutas metabólicas de la citosina; la metilación ocurre en el carbono número cinco por acción de la DNA metiltransferasas, las cuales utilizan S-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo. La 5 metil citosina por desaminación hidrolítica puede generar mutaciones por transición de C-T. Los CpG no metilados por desaminación generan uracilo, el cual si no es reparado por las DNA glicosilasas, en la siguiente ronda de replicación del DNA la polimerasa va a generar una mutación a timina

La metilación en las islas CpG es un mecanismo de control de la expresión génica en tejidos adultos que está restringida a dos clases de genes; primero, la inactivación del cromosoma X en mujeres, en donde la metilación generalizada de

las islas CpG en los promotores de los genes del cromosoma X se asocia con la represión del mismo.⁵⁷ Segundo, en la “impronta genómica”, donde sólo uno de los alelos heredados es expresado (ya sea el del padre o el de la madre), la inactivación del alelo no expresado se asocia con metilación en su promotor.¹⁰

La metilación del DNA es un mecanismo que regula la expresión génica que posee una gran diversidad de funciones como; la modulación de la estructura de la cromatina, biología del desarrollo, mecanismo de defensa contra la invasión de DNA extraño y alteraciones en su regulación se asocia con algunas enfermedades y cáncer.^{70,23}

Es aceptado en general que la metilación del DNA se asocia a represión transcripcional ya que hay regiones de DNA que se mantienen estabilizadas por metilación, tal como las regiones pericentroméricas o elementos genéticos móviles como; retrovirus endógenos y retrotransposones (LINES y SINES). Esta represión es un mecanismo de defensa de la célula hospedera³³ ya que la reactivación por desmetilación inducen inestabilidad cromosómica y eventos mutacionales.^{14,145} Por lo tanto, no hay duda de que la metilación desempeña una función importante en el mantenimiento de la salud del organismo y que una fuerte presión selectiva opera para mantener la metilación de las citosinas en eucariotes, ya que mutaciones en las DNMTs son letales para el organismo.³²

El genoma humano exhibe una disminución de CpG, presumiblemente por la alta hipermutabilidad de la 5-metilcitosina (5mC). Sin embargo, el genoma también contiene fragmentos de unas pocas kilobases ricas en CpG, denominadas islas CpG que se localizan en la región promotora de los genes. A diferencia del resto del DNA donde los CpG están metilados, los CpG de las islas se encuentran usualmente libres de metilación en tejido adulto y este patrón de metilación del DNA es heredado de manera estable de una generación celular a la siguiente.³²

En el humano aproximadamente el 1% de todas las bases son 5mC y se encuentran mayoritariamente en los CpG, y de esos entre el 60 y el 90% están metilados, con la excepción de las islas CpG las cuales son transcripcionalmente

activas. Existen cerca de 30,000 islas CpG, y aproximadamente el 50 al 60% de ellas están asociadas con la región promotora de los genes.²³

1.4.2 Represión transcripcional por metilación del DNA

El papel de la metilación del DNA en la regulación diferencial de la expresión génica fue sugerida por observaciones en las que los CpGs que estaban dentro o adyacentes a genes, correlacionaban con represión transcripcional.^{114,134} Subsecuentemente, la relación inversa entre mCpGs y transcripción ha sido observada en un gran número de genes, no obstante, no es una regla universal. En general es aceptado que la metilación del DNA se asocia con el silenciamiento transcripcional.^{32,71}

1.4.2.1 Mecanismos de silenciamiento transcripcional por metilación del DNA

1) El primer mecanismo involucra la interferencia directa con la unión de factores de transcripción a sus sitios de reconocimiento en las regiones promotoras del DNA metilado. Se han identificado factores de transcripción que son incapaces de reconocer su secuencia en el DNA cuando éste está metilado,¹²⁹ un ejemplo de ellos es la proteína viral E2 de VPH-16.⁷⁶ Sin embargo, algunos factores de transcripción reconocen su secuencia consenso en el DNA, independientemente si está o no metilado, tal como *Sp1*⁵⁴ y otros factores de transcripción no tienen sitios CpG dentro de sus secuencias de reconocimiento (Figura 9, panel 1).

2) Un segundo mecanismo involucra a una familia de proteínas con dominio de unión a grupos metilo (*MBD*), las cuales se unen a mCpG.^{iError! Marcador no definido.} Al menos 3 de 5 miembros de esta familia (*MeCP2*, *MBD1* y *MBD2*) tienen la capacidad de reprimir la transcripción por su asociación con un gran complejo de proteínas con actividad de *HDACs* (*HDAC1* y *HDAC2*)^{99,151} y proteínas de remodelaje de la cromatina (*Sin 3a* y *mi-2*).

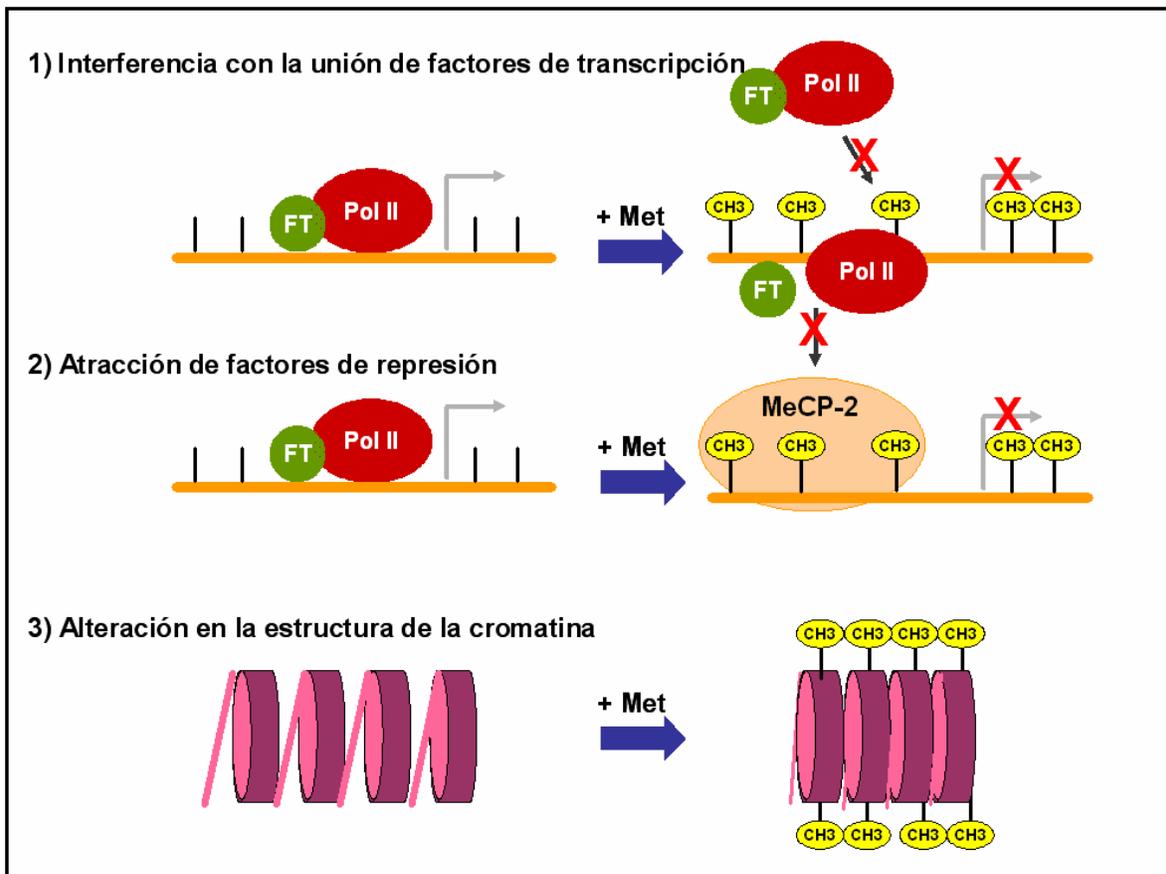


Figura 9. Metilación de DNA y represión transcripcional

La metilación de la citosina en la posición 5 o impide la unión de factores transcripcionales (1) o el DNA metilado es reconocido por enzimas con dominios MBD que reconocen DNA metilado e inducen la compactación de la cromatina (2), ó simplemente compacta más a la cromatina (3).

La acción de estas proteínas favorece la formación de heterocromatina, la cual es refractaria a la maquinaria de transcripción celular (Figura 9, panel 2).¹³³ La MBD3 en mamíferos no se une a mCpG, pero forma parte de un complejo correpressor llamado NuDR, el cual participa en la represión transcripcional a través de desacetilación de histonas. *MBD4* es el único miembro de la familia *MDB* que no participa en la regulación transcripcional, su función es reducir el riesgo de mutaciones (5mC a T) que ocurren por transiciones debidas a desaminación, remueve la base mutada T y elimina el uracilo producto de la desaminación CpG no metiladas³²

3) Un tercer mecanismo sugiere que la metilación puede mediar la represión transcripcional alterando la estructura de la cromatina, en donde participan proteínas que modulan a esta última durante el proceso transcripcional. Estas proteínas pueden ser permisivas para la que la DNMT1 metile o no al DNA, de tal forma que ciertas áreas pueden ser protegidas de la metilación y otras puedan ser metiladas (Figura 9, panel 3).

1.4.3 Metilación de DNA y cáncer

Por lo expuesto anteriormente queda claro que la metilación del DNA es uno de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica por lo que resulta comprensible que su alteración sea muy común en la carcinogénesis. Los cambios asociados al desarrollo de tumores incluyen hipometilación global e hipermetilación regional en el DNA en las células tumorales,⁶⁹ y también incrementan la probabilidad de mutaciones por transición C/T en sitios mCpGs.³²

La hipermetilación común observada en cáncer se halla en las islas CpG de las regiones promotoras de genes supresores de tumor (GST), y un número creciente de GST con islas CpG han mostrado ser inapropiadamente metilados en diferentes tipos de tumores,²³ esta hipermetilación aberrante correlaciona con silenciamiento transcripcional y pérdida de la función del gen.¹³³ También la contraparte ha sido observada en el proceso carcinogénico, la incorrecta hipometilación de genes improntados induce la reactivación de copias del gen improntado, este es un evento observado en distintas enfermedades y cáncer.^{10,145}

Se considera que las enzimas responsables de la hipermetilación en GST son *DNMT1* y *DNMT3b*, ya que se encuentran sobreexpresadas en células cancerosas, en múltiples tipos de tumores hay un incremento del mRNA de *DNMT1* de la proteína, así como de su actividad y este incremento puede ser un evento permisivo que coopera con cambios locales que vuelven las islas CpG susceptibles a la metilación.⁷⁵

Los CpG no son exclusivos de regiones promotoras, aunque con menor frecuencia también se les encuentra en las regiones codificadoras de los genes, donde se encuentran como mCpG. Debido a su inestabilidad son hipermutables y son sitios “*hotspots*” de mutaciones de los genes que los contienen.^{32,71}

De acuerdo con lo mencionado, se propone que la metilación del DNA en el proceso de la oncogénesis parece ser mediada por uno o más de los siguientes mecanismos:

1.4.3.1 Mutaciones puntuales C → T en células cancerosas

Genes importantes en el desarrollo de cáncer y enfermedades genéticas humanas tienen secuencias mCpG en sus regiones codificadoras las cuales son “*hotspots*” de mutaciones. Como ya se mencionó, la 5mC es genéticamente inestable y con frecuencia muta por desaminación de la 5mC y por errores en el sistema de reparación *mismatch*, resultando en una transición 5mC → T. Sin embargo, la transición también se puede dar por mutágenos endógenos y exógenos (Figura 10 panel A).^{32,71,81}

La hipermutabilidad se considera un posible origen de mutación genética en tumores, que si tiene lugar en línea germinal induce enfermedades hereditarias, pero si ocurre en células somáticas puede llevar a la inactivación de GST e inducir carcinogénesis. Tal es el caso de p53 y Rb que tienen mCpG en sus regiones codificadoras, que por su inestabilidad son hipermutables y son sitios “*hotspots*” mutacionales C/T. La mutación en p53 es la alteración más común en cáncer humano y se ha estimado que más del 50% de los cánceres en humanos tienen una transición en este gen, la cual se asocia a la elevada desaminación endógena de la 5mC y a la falla en los mecanismos de reparación cuando hay apareamiento ilegítimo “*mismatch*”.⁸⁶ Igualmente, se han reportado mutaciones por transición en el gen Rb, por hipermutabilidad en las mCpG que se localizan en sus regiones codificadoras que también actúan como “*hotspots*” para mutaciones puntuales.⁷¹

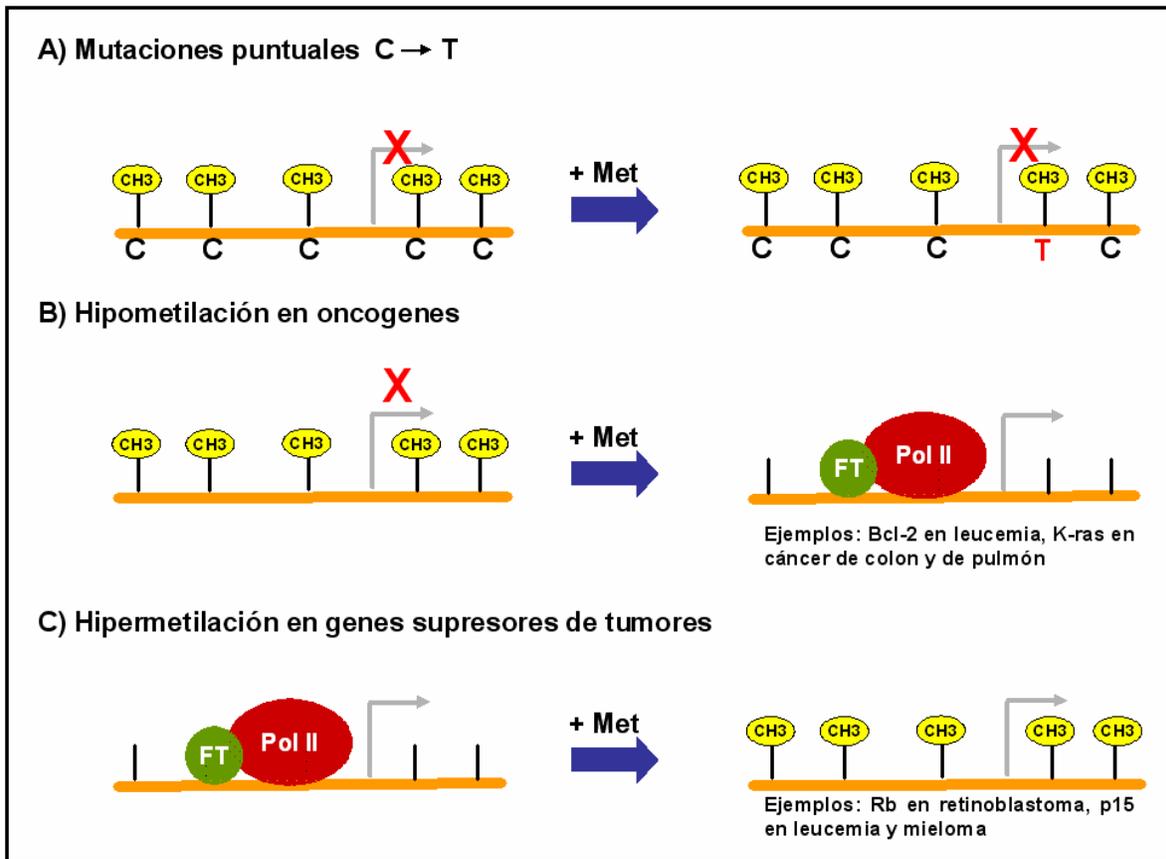


Figura 10. Probables mecanismos de carcinogénesis por metilación del DNA

Las figuras esquematizan los posibles mecanismos mediante los cuales la metilación podría llevar a la carcinogénesis. A) La desaminación hidrolítica de la 5mC produce mutaciones por transición de citosina a Timina. B) Aparte de la hipometilación global de secuencias mCpG, también la hipometilación de oncogenes induce su expresión en cáncer, tal como el incremento en la expresión de el gen antiapoptótico BCL-2 y el protooncogen K-ras. C) La hipermetilación de genes supresores de tumores es un mecanismo de inactivación y es común en cáncer.

La mutación de p53 por transición es muy común en cáncer de colon (50%), mientras que solo el 10% de cáncer de pulmón o hígado tienen esta mutación. En cáncer de pulmón las mutaciones más habituales son transversiones G → T, debido principalmente al benzo pireno, el cual daña las bases de guanina al formar aductos en ellas. El benzo pireno, encontrado en el humo de tabaco tiene mayor afinidad por los mCpG que los CpG no metilados. En general las transversiones son frecuentes en cáncer de pulmón, cáncer de hígado y tumores de laringe, los cuales son debidas a consumo de tabaco principalmente.^{32,71}

1.4.3.2 Hipometilación del DNA en cáncer

En términos de carcinogénesis la primera observación reportada fue la hipometilación global, (Figura 10 panel B), la cual parece comenzar en etapas tempranas, antes del desarrollo del tumor y es progresiva en la carcinogénesis y puede llegar a ser de un 60% menor que su contraparte normal. La hipometilación sucede en regiones intergénicas, intrónicas, DNA satélite, en secuencias *SINES*, *LINES* y retrovirus endógenos, las cuales se encuentran normalmente silenciadas por hipermetilación en todos los tejidos para preservar la estabilidad cromosómica.³² La hipometilación de estas secuencias en tejido somático y células germinales a nivel global ó gen específica induce la activación de elementos genéticos móviles y la sobreexpresión de genes que incrementa la inestabilidad cromosómica, ya sea por inducción de mutaciones ó recombinación cromosómica las cuales favorecen la progresión de enfermedades neoplásicas.¹⁴⁵

La hipometilación global parece ser un evento temprano en algunos tipos de cáncer como el de colon, de seno y leucemia linfocítica crónica, aunque también se ha observado en tejido de mucosa normal de colon, lo que sugiere una probable función en el inicio de la enfermedad.¹⁴⁵ Uno de los mecanismos que se propone para la hipometilación es la desaminación de 5mC que produce T, la cual debe ser reparada y remetilada para mantener el patrón de metilación. Si esta remetilación no ocurre o se produce una acelerada desaminación, se estimula la desmetilación del genoma, esta hipótesis de hipometilación genómica es un modelo de trabajo que todavía no ha sido probada.

1.4.3.2.1 Hipometilación como indicador diagnóstico y pronóstico

La hipometilación se ha sugerido como un posible marcador en el diagnóstico y pronóstico, por ejemplo la hipometilación del DNA en regiones satélite en algunas enfermedades como distrofia muscular, síndrome *ICF* (del inglés síndrome de inmunodeficiencia y anormalidades faciales) y diferentes tipos de cáncer.¹⁴⁵ Algunos retrovirus endógenos son desmetilados en algunos tipos de cáncer como ovario,

testículo y vejiga, en todos esos casos la hipometilación es directamente proporcional con el grado de malignidad y con frecuencia se asocia con expresión de transcritos, lo que sugiere que podría usarse como un posible biomarcador de progresión en esos tipos de cáncer.³² Otra familia de retrotransposones son los que no tienen *LTR*, ésta incluye a los *LINES* y *SINES*, los cuales poseen promotores fuertes y codifican para una integrasa lo que favorece su inserción, la hipometilación de *LINES* se ha observado en cáncer de colon y próstata donde no se ha encontrado correlación con el estadio del tumor, mientras que en otros tipos de cáncer (leucemia, urotelial, ovario y mama) la hipometilación correlaciona e incrementa con el grado de malignidad.^{32,71}

La hipometilación de genes ocurre en algunos tipos de cáncer como colon, páncreas y mama, la cual correlaciona con un aumento en el nivel de transcripción del gen afectado.³⁸ Los genes afectados incluyen genes que regulan el crecimiento celular, enzimas, genes de desarrollo, genes específicos de tejido, tales como *MAGE*, *BAGE*, *LAGE* y *GAGE*, etc. También se ha observado la sobreexpresión de protooncogenes como *Ras*,¹⁰⁰ y ciclina D2 en cáncer gástrico y maspin en cáncer colorrectal.¹⁰⁵ Otro tipo de genes asociado a hipometilación son los genes improntados, los cuales al hipometilarse se pierde la impronta, lo que resulta en la expresión bialélica que puede ayudar a la progresión del tumor, un ejemplo de pérdida de la impronta en cáncer de colon es el gen *IGF2*.²⁵

1.4.3.3 Hipermetilación en genes supresores de tumor y cáncer

Las islas CpG de muchos genes están desmetiladas en tejido normal, pero están metiladas en diferente proporción en múltiples tipos de cáncer humano, esta metilación aberrante se asocia con una disminución o completo silenciamiento en la expresión del gen involucrado en las células tumorales cuando se compara con tejido normal a partir del cual se generó el tumor, aunque por otro lado se sabe que las islas CpG llegan a ser metiladas con la edad.^{32,113}

Además de mutaciones puntuales, deleciones o amplificaciones génicas, la represión transcripcional por hipermetilación de secuencias promotoras en GST es

un mecanismo alternativo de inactivación génica que se ha descrito en diversos tipos de tumor (Figura 10 panel C).^{133,113} Esto podría ser consecuencia de los niveles aumentados de las metiltransferasas, las cuales están sobreexpresadas en varios tipos de cáncer.⁷⁵ El primer supresor que se reportó que estaba silenciado por metilación fue Rb,⁸⁵ posteriormente, el número de reportes de genes que están silenciados por este mecanismo ha incrementado.

Muchas vías de señalización son inactivadas por este tipo de lesión epigenética, dentro de los genes que son susceptibles de ser silenciados por hipermetilación están los involucrados en la regulación del ciclo celular (p16, p15, Rb y p14), genes asociados con reparación de daño a DNA (BRCA1, MGMT, hMLH1), apoptosis (DAPK, TMS1), adhesión celular (E-caderina, CDH1, CDH13) detoxificación (GSTP1) y el gen de Von Hippel-Lindau (VHL).^{32,23,133} La hipermetilación aberrante puede ser un evento temprano en la progresión neoplásica, pero por otro lado, se ha mostrado que un incremento en la metilación es directamente proporcional a la edad.¹¹³

El silenciamiento por hipermetilación de genes implicados en reparación de daño a DNA tal como hMLH1, MGMT y BRCA1 cambia el ambiente celular, por ejemplo la hipermetilación de hMLH1 es la causa principal de inestabilidad de microsatélite en cáncer de recto, endometrio y gástrico. La inactivación por hipermetilación de MGMT en algunos tumores acumula mutaciones por transición G→A, algunos de los genes afectados son K-ras y p53.

1.4.3.3.1 Hipermetilación como marcador pronóstico y predictor de respuesta al tratamiento en cáncer

Se ha demostrado que cada neoplasia posee un perfil particular de genes hipermetilados, genes como RASSF1A y p16 son metilados en una gran variedad de tumores, mientras que otros genes son específicos de tipos particulares de cáncer. Por ejemplo, el gen GSTP1 está hipermetilado en más del 90% en cáncer de próstata, pero es hipometilado en leucemia mieloide aguda. Muchos tumores muestran algún grado de hipermetilación en uno o más genes. En cáncer de

pulmón hay más de 40 genes con algún grado de metilación aberrante, algunos de esos genes son RAR β , RASSF1A, CDNK2A, CHD13 y APC. En cáncer de seno hay hipermetilación de genes de adhesión celular e inhibidores de las proteinasas, receptores a esteroides, los más comúnmente hipermetilados son p16, receptor de estrógenos (ER) alfa, receptor de progesterona (PR), BRCA1, GSTP1 y E-caderina.⁷¹ Diversos tipos de genes como calcitonina, p15, p21, ER y MDR están hipermetilados en una gran diversidad de desordenes hematológicos, por ejemplo se ha sugerido a p15 como marcador de transformación leucémica aguda mieloide y al gen de calcitonina en leucemias agudas.³²

La hipermetilación también se puede utilizar como marcador pronóstico, por ejemplo un marcador de pobre pronóstico es el gen DAPK (death-associated protein kinasa). La hipermetilación de p16 se asocia a la agresividad del tumor en cáncer de pulmón y colorrectal, en neuroblastoma la hipermetilación del gen HOXA9 está asociada con pobre sobrevivencia, sin embargo, la metilación de RAR β 2 es un excelente marcador de buen pronóstico.⁷¹ Por otro lado, la metilación también se puede usar para predecir la respuesta de medicamentos al tratamiento, por ejemplo la hipermetilación de MGMT puede ser un buen candidato para predecir la respuesta a la quimioterapia de tumores con tratamiento con agentes alquilantes, como se ha observado para pacientes con glioma y linfoma, los cuales han sido tratados con agentes alquilantes y donde se determinó que puede ser un marcador de buena respuesta a la quimioterapia, mayor tiempo de sobrevida, tiempo de progresión y en general de buena respuesta al tratamiento clínico.

1.4.4 Metilación del DNA de los papilomavirus

La metilación del genoma del VPH *in situ* ha sido estudiada y determinada en CaCU, y es uno más de los mecanismos que participan en la regulación de la transcripción del genoma viral. Esta aseveración se basa en: primero que los dinucleótidos CpGs son escasos en los VPHs, de manera similar a su hospedero humano. Segundo, cuando el DNA del VPH-16 fue metilado *in vitro* y transfectado en líneas celulares fue incapaz de expresarse,¹⁰⁹ tal y como ocurre con el DNA de

VPH-16 resistente a Eco RI por estar metilado.⁸⁴ Tercero, recientes estudios por *Badal L y S,*⁷ *Kalantar M*⁷³ y *Turan T*¹³² revelaron que:

- i) El DNA del VPH-16 es blanco eficiente de metilación
- ii) Las regiones hipermetiladas se distribuyen asimétricamente en el genoma viral
- iii) La metilación ocurre en CpGs que se localizan en el promotor, el *enhancer* y el gen L1
- iv) La frecuencia de la metilación de los CpGs incrementa durante las etapas progresivas del cáncer, donde es consistentemente hipermetilado en cáncer, hipo o desmetilado en pacientes asintomáticas y lesiones precursoras
- v) Hay una correlación consistente entre la frecuencia de metilación y la severidad de la neoplasia, y se le ha propuesto como un posible biomarcador de progresión carcinogénica

Estos hallazgos sugieren que la metilación de los dinucleótidos CpG está involucrada con la etiología del cáncer y podría ser utilizada como marcador diagnóstico del estado carcinogénico.

1.4.4.1 Los inicios de los estudios de metilación de DNA en papilomavirus

Cuando hay una infección viral y el virus se integra al DNA de la célula hospedera, se puede iniciar un mecanismo de defensa por parte de la célula hospedera como la activación de la maquinaria de metilación, la cual ocurre en el virus y en la célula misma.¹³⁹ La metilación de DNA en los genomas de los VPH 1 y PV de conejo *cottontail* fue descrita desde hace 20 años, donde se sugirió que los PVs son blanco de la maquinaria de metilación celular,²⁸⁻²⁰ pero su función en la expresión génica y la carcinogénesis no fue del todo comprendida.

Uno de los primeros indicios de la importancia de la metilación y la expresión de genes virales viene de estudios de tranfección celular con genomas de VPH-16 metilados *in vitro*, demostrando que bajo esas circunstancias el DNA se encuentra

transcripcionalmente reprimido,¹⁰⁹ y también se sugería que la metilación podría influir en el ciclo de vida viral ya que la metilación *in vitro* de los sitios de unión a E2 impedía que éste reconociera su secuencia consenso,¹³⁰ un año después se dedujo que la actividad transcripcional del *enhancer* se reducía debido a que la metilación de éste impedía la unión de un factor de transcripción celular llamado MSPF.⁸⁴ Investigaciones posteriores se enfocaron a tratar de comprender la función de la metilación en el ciclo de vida viral.

1.4.4.2 Ciclo de vida y metilación de papilomavirus

Con la evidencia de que la metilación de la LCR reduce la transcripción viral,⁸⁴ y la demostración de que la metilación de los CpG a los cuales se une E2 inhibe la unión de ésta al DNA cuando éste es metilado *in vitro*¹³⁰ estos hechos hacían pensar que la metilación podría influir en el ciclo de vida viral, así como en la función de E2. *Kim* y cols realizaron un análisis de metilación de los sitios de unión a E2 dentro de la LCR en DNA aislado de una línea celular que contenía episomas de VPH-16, y demostró que el estado de metilación del genoma viral varían dependiendo del estado de diferenciación celular, encontrándose hipometilada en la población celular altamente diferenciada, mientras que en las células basales las cuales están pobremente diferenciadas fueron hipermetilados los sitios de unión a E2. Estas observaciones muestran que el estado de metilación del genoma viral y en particular de los sitios de unión a E2 varían durante el ciclo de vida viral, lo cual proporciona otro mecanismo para modular la función de E2 como la infección progresa.⁷⁶

1.4.4.3 Metilación de DNA en los VPH y cáncer

Sin embargo, se ha mostrado que la metilación de DNA integrado de líneas celulares de CaCU y de cáncer primario asociado a VPH reprime la transcripción del DNA viral, pero deja uno o dos centros de transcripción activos por célula en las

regiones perinucleares.^{136,137} Estudios *in situ* con las líneas celulares SiHa y CaSki así como con muestras de pacientes reportaron que la metilación del DNA en VPH-16 es un mecanismo de silenciamiento transcripcional el cual ocurre con más frecuencia en la LCR y parte del gen L1 que en otras regiones del genoma,^{7,6} estas regiones se encuentran río arriba del promotor y no se transcriben cuando el genoma del VPH está integrado en el genoma de la célula hospedera.⁷³

En las líneas celulares SiHa y CaSki las cuales tienen una y múltiples copias del genoma de VPH-16 integrado, respectivamente, conservan un perfil de no metilación e hipermetilación en la región LCR. Sin embargo, la evaluación del nivel de metilación del DNA en muestras clínicas reveló que hay una progresiva hipometilación en el DNA conforme incrementa la severidad neoplásica y que la transformación puede ser reprimida por hipermetilación, mientras que la hipometilación acompaña o causa la progresión a cáncer.⁷ Sin embargo, estos hallazgos no coinciden con otro estudio posterior en donde se reporta heterogeneidad en la frecuencia de metilación entre muestras de diferentes pacientes y aún entre diferentes clonas del mismo paciente, sin embargo, hay hipermetilación más alta en carcinomas que en displasias o lesiones de bajo grado.⁷³ Un estudio en líneas celulares y muestras clínicas con VPH-18 también revelaron heterogeneidad en los patrones de metilación.⁶ Sin embargo, estudios más recientes han sugerido que la región 3 del gen L1 de VPH-18 podría utilizarse como un posible marcador de progresión neoplásica.^{132,131} Los últimos dos estudios sugieren que el estado de metilación es quizás el resultado del nivel de actividad transcripcional y no un evento causal para la progresión neoplásica.

Estos hallazgos indican que la metilación correlaciona con la patogénesis de VPH y la eficiente metilación del DNA se puede asociar con la progresión del desarrollo de CaCU, ya que la hipermetilación es más común en carcinomas que en displasias.^{73,131} Estos hallazgos también han sido reproducibles en epitelio de ano infectado con VPH-16, en neoplasia intraepitelial anal de bajo grado, la metilación es alta en el *enhancer* viral, pero poco frecuente en el promotor, en neoplasia

intraepitelial de alto grado, la metilación es más alta en la región del promotor.¹⁴⁴ Sin embargo, la metilación del DNA en cáncer parece que no es específica del DNA de VPH, más bien ocurre como un evento frecuente del genoma de la célula huésped. La frecuencia de hipermetilación en muchos genes celulares se ha encontrado que incrementa significativamente con un incremento en la severidad de la neoplasia.^{39,150}

De acuerdo a los datos publicados se generan las siguientes hipótesis: la infección de VPH en células basales el genoma viral es reconocido por la maquinaria de metilación celular *de novo* y llega a ser transcripcionalmente reprimido, un mecanismo que puede llegar a ser importante para una infección viral subclínica. Esto puede inducir un estado de replicación viral latente, ya que el origen de replicación normalmente permanece desmetilado y por lo tanto funcional, una vez que el genoma viral escapa de la metilación a través de la replicación durante la diferenciación del epitelio, el genoma llega a ser transcripcionalmente activo induciendo la transformación de la célula e induciendo el ciclo de vida viral completo. Cuando el DNA viral se integra al genoma de la célula hospedera durante la tumorigénesis, muchos de los genomas virales llegan a ser metilados y transcripcionalmente reprimidos, pero solo las células que retienen los genomas transcripcionalmente activos crecen dentro del tumor.

La metilación puede ser como un mecanismo de defensa celular así como propiedades seleccionadas durante la evolución del VPH, al favorecer el mantenimiento subclínico y distribución de los VPH, proporcionando probablemente, otro ejemplo de la serie de propiedades que hacen a los PVs con frecuencia comensales más que patógenos, una característica común en la familia de estos virus.

Capítulo II

Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

La Infección con VPH-16 es la causa de la mayoría del CaCU y de algunos casos de carcinomas de amígdalas. Sin embargo, también se ha detectado en CECB. pero los datos epidemiológicos y moleculares son pocos y la asociación causal del virus con el CECB no son concluyentes. Por eso es importante aportar y consolidar evidencia para entender el papel que tiene el VPH-16 en el desarrollo del CECB.

La metilación del DNA de VPH forma parte del ciclo de vida del virus y también se encuentra asociada al proceso carcinogénico. El estado hipometilado de VPH-AR es característico en infecciones asintomáticas, mientras que la hipermetilación, sobre todo del gen L1 es frecuente en cáncer de la región anogenital en el que el VPH tiene una relación causal evidente, esta hipermetilación se ha propuesto como posible marcador de progresión carcinogénica en CaCU.

De acuerdo a lo anterior, analizar el patrón de metilación en el VPH-16 en infecciones asintomáticas y casos de CECB, podría ayudar a demostrar las propiedades epigenéticas que tiene el VPH-16 en células de la cavidad bucal, así como la posible asociación entre metilación y carcinogénesis en este tipo de cáncer.

2.2 Hipótesis

El patrón de metilación del DNA del VPH-16 en CECB podría ser similar al de CaCU y por lo tanto este patrón se podría asociar con la carcinogénesis bucal.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

Realizar un análisis detallado de la frecuencia de metilación del la LCR, del gen L1 y el extremo 3' del gen L2 del VPH-16 en muestras normales y con carcinoma de la cavidad bucal, para conocer si la metilación del VPH-16 participa en el progreso carcinogénico.

2.3.2 Objetivos Particulares

1. Obtener muestras control y biopsias de CECB y seleccionar las positivas a VPH-16.
2. Determinar el estado de metilación en el extremo 3' del gen L1 y en la LCR de VPH-16 en líneas celulares SiHa y CaSki.
3. Determinar el estado de metilación en el extremo 3' del gen L1 y en la LCR de VPH-16 en muestras control.
4. Determinar el estado de metilación del gen extremo 3' del gen L2, el gen L1 y en la LCR de VPH-16 en carcinoma epidermoide de la cavidad bucal.
5. Determinar la frecuencia y los patrones de metilación en los casos de CECB y compararlos con los controles, con las líneas celulares SiHa/CaSki y con lo reportado para CaCU.

Capítulo III

Materiales y métodos

3.1 Material biológico y reactivos

3.1.1 Material biológico

Las muestras de éste estudio pertenecen al proyecto de doctorado de C.D Gabriela Anaya Saavedra titulado “La infección por el virus de papiloma humano como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer bucal e identificación de los patrones de metilación en la región larga de control de VPH-16“. Un estudio epidemiológico de casos y controles con cáncer bucal, cuyos resultados serán publicados de manera independiente por la C.D. Gabriela Anaya Saavedra.

El proyecto incluyó 62 casos consecutivos con diagnóstico de carcinoma epidermoide de la cavidad bucal, histológicamente confirmados, sin tratamiento previo que asistieron al departamento de cabeza y cuello del Instituto Nacional de Cancerología de la SSA. Durante el periodo comprendido de septiembre del 2003 a julio del 2006. La localización topográfica incluyo carcinomas de la lengua, la encía, el piso de la boca y el área retromolar, se excluyó cáncer de labio, y carcinomas de las glándulas salivales, nasofaringe, orofaringe y laringe. Todos los casos fueron estatificados de acuerdo con el sistema de clasificación *AJCC*.²

Se incluyeron cuatro controles por cada caso apareados en edad y género, sin ningún tipo de lesión bucal maligna o premaligna y sin historia de cáncer, se incluyeron dos controles de servicio médico, y dos de servicio dental. El Hospital General Gea González, SSA, México DF y la clínica Estomatológica “Rafael Lozano” de la UAM Xochimilco. Los controles no tenían ningún tipo de alteración sistémica de importancia para participar en el estudio, criterio evaluado de acuerdo a la historia médica. Los criterios de exclusión fueron enfermedad mental que dificultara el consentimiento, historia de cualquier tipo de cáncer, historia o

presencia de lesiones orales premalignas o malignas, e individuos que no quisieron participar en el estudio.

El estudio fue aprobado por el comité de ética de cada institución y cada paciente firmó una carta de consentimiento para participar en el estudio. Como controles se utilizaron dos líneas celulares SiHa y CaSki ambas con VPH- 16, provenientes de CaCU.

3.1.2 Población de estudio para el análisis de metilación en CECB

De 15 muestras de CECB positivas a VPH-16, doce tuvieron suficiente DNA para realizar el análisis de metilación. Las características clínicas y demográficas de esos doce pacientes se reportan en la Tabla 1. La proporción en el género es 1:1, el rango de edad es desde 31 hasta 75 años con una media de 55 años.

Con respecto a los hábitos de tabaquismo: el 58% de la población (n=7) no consumía tabaco, el 33% (n=4) tuvo consumo de tabaco fuerte y el 8.3% (n=1) tuvo un ligero consumo de tabaco y. En lo que concierne al consumo de alcohol, el 83% no consume alcohol y el resto tuvo un consumo ligero (n=1) y moderado (n=1) de alcohol.

Las muestras provienen de cuatro sitios anatómicos diferentes: siete provienen de la lengua, tres de la encía, una del paladar y una del piso de la boca. Con relación al estadio clínico el 50% (n=6) se encontraba en estadio III, el 33% (n=4) estaba en estadio IV y 16% (n=2) restante se encontraba en estadio I.

En lo que corresponde al grado histológico el 66.6 % (n=8) de la población de estudio mostró un grado histológico de tumor bien diferenciado, mientras que el 33.3% (n=4) mostró un grado histológico moderadamente diferenciado. Con respecto a la metástasis, solo un carcinoma (C6) presento metástasis, el cual presento un fuerte consumo de tabaco y un grado histológico moderadamente diferenciado.

En general, la mayor proporción de la población no consumía tabaco (60%) ni alcohol (83%), el tumor más frecuente fue el de lengua. La mayoría de la población cursaba en estadio avanzado III y IV, y con respecto al grado histológico la mayoría tenía un tumor de moderadamente a bien diferenciado.

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes con CECB y VPH-16 incluidos en este estudio

Muestra	Género	Edad	Consumo de tabaco ¹	Consumo de Alcohol ²	Sitio anatómico	Estadio clínico ³	Grado histológico
C1	F	52	Fuerte	No	Encía	IV	Moderadamente diferenciado
C2	M	62	Fuerte	No	Lengua	III	Bien diferenciado
C3	M	31	No	No	Paladar	III	Bien diferenciado
C4	M	53	No	No	Lengua	III	Bien diferenciado
C5	F	75	No	No	Encía	III	Bien diferenciado
C6 ⁴	M	55	Fuerte	Ligero	Lengua	IV	Moderadamente diferenciado
C7	F	59	No	No	Lengua	I	Bien diferenciado
C8	F	56	No	No	Lengua	IV	Bien diferenciado
C9	M	71	Fuerte	Moderado	Piso de boca	IV	Moderadamente diferenciado
C10	F	66	Ligero	No	Lengua	III	Bien diferenciado
C11	M	57	No	No	Encía	I	Bien diferenciado
C12	F	31	No	No	Lengua	III	Moderadamente diferenciado

¹Consumo de tabaco ligero: < 5 cigarros por día, Consumo moderado: 5-10 cigarros por día, Consumo fuerte: > 10 cigarros por día. ²Consumo de alcohol ligero: < 2 unidades de alcohol por semana, Moderado consumo de alcohol: 5-10 unidades de alcohol por semana, Fuerte consumo de alcohol: > 10 unidades de alcohol por semana. ³La clasificación del estadio clínico y grado histológico se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la AJCC.²

3.1.3 Reactivos

Para la conservación de las muestras se utilizó el reactivo *PreservCyt* adquirido de *Cytec Corporation de Boxborough, MA, EUA*. Para la extracción de DNA se utilizó el estuche comercial, *Wizard Genomic DNA Purification Kit* de Promega. La enzima proteinasa K fue adquirida de *Roche Diagnostics Corporation*. Para la modificación del DNA con bisulfito se utilizó el estuche *EZ DNA Methylation Gold Kit* de *Zymo Research*.

Los oligonucleótidos utilizados fueron obtenidos de la compañía *Sigma Genosys*. El buffer de reacción, cloruro de magnesio y las enzimas Taq DNA polimerasa de *promega*, la *Taq Gold* DNA polimerasa de *Applied biosystems*, y los dNTPs de *Invitrogen*. Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de *Sigma Chemical company*. Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizaron las escaleras de marcadores de tamaño de DNA de 100 pb adquiridos a la compañía *Invitrogen*.

Para la clonación de los productos amplificados se utilizó el estuche comercial *TOPO TA Cloning* de *Invitrogen*, y las células químicamente competentes *TOP 10* de la misma compañía. Para la purificación de los productos amplificados y clonados se utilizaron las enzimas SAP (*Shrimp Alkaline phosphate*) y Exonucleasa I (*Exo I*) de la compañía USB, así como el estuche comercial *QIAquick PCR purification* de *Qiagen Corporation*. Para los productos purificados a partir de agarosa se utilizó el estuche comercial de *Qiagen QIAquick Gel extracción* de la misma compañía.

La reacción de secuenciación se realizó con el estuche comercial *Abi Prism Big Dye™ Terminator Versión 3.1* de la compañía *Applied Biosystems*. La precipitación de los productos secuenciados se realizó con Acetato de sodio y etanol de *Sigma Chemical Company*.

3.2 Métodos

3.2.1 Colección y procesamiento de muestras

Las muestras de los casos consistieron en extracción por punción de biopsia, de los controles se obtuvieron células exfoliadas de la cavidad bucal. En ambos casos el material biológico se depositó en un medio de transporte (*PreservCyt*) y fueron conservadas a -20°C hasta su uso. El departamento de patología hizo el diagnóstico histopatológico de todos los casos.

Las muestras conservadas en *PrecervCyt* se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 min, después se colocaron en una placa de calentamiento a 37°C por unos minutos, con la finalidad de eliminar el metanol, el cual es el principal componente del *PrecervCyt*. Una vez obtenida la pastilla celular, se continuó con la extracción del DNA.

3.2.2 Extracción de DNA genómico

El DNA de las líneas celulares y de las muestras clínicas se extrajo mediante el estuche comercial *Wizard Genomic DNA Purification* y con proteinasa K, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante como se describe a continuación: Las células se lisaron con 600 μl de solución de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl, 0.5 % SDS, 10 mM de EDTA, 50 mM de NaCl), se adicionó 17.5 μL de la enzima proteinasa K (10 mg/mL), se incubó a 65°C por 1 o 2 horas. Posteriormente se adicionó 1.5 μl de RNasa por 30 minutos a 37°C . Después se agregó 200 μl de solución precipitante de proteínas, agitando para homogeneizar la solución e incubando por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido es el DNA al cual se precipitó con 500 μl de isopropanol, se agitó y centrifugó 1 minuto a 14000 rpm a temperatura ambiente. El DNA precipitado se lavó con 600 μl de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente, se decantó el sobrenadante, se dejó secar el DNA que quedó precipitado y finalmente

se resuspendió en TE 1X (Tris-HCl 10 mM a pH 7.5 y EDTA 1 mM) incubando por 1 hora a 65°C.

3.2.3 Cuantificación y verificación de la calidad del DNA genómico.

Para conocer la concentración de DNA se hicieron lecturas en un espectrofotómetro, para corroborar la calidad del mismo se amplificó por PCR un gen de expresión invariable (House-keeping), de β -globina.

Para la amplificación del gen β -globina se utilizaron los oligonucleótidos GH20 y PCO4, los cuales amplifican una región de 268 pb. La secuencia de los mismos son las siguientes: oligonucleótido PCO4 5-CAACTTCATCCACGTTTCCAC C-3, oligonucleótido GH20 5-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3. La concentración de cada uno de los reactivos fue la siguiente; el volumen final de reacción fue 25 μ L conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 pMol de cada oligonucleótido y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: después de 10 minutos de desnaturalización a 94°C, se realizaron 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento 55°C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

3.2.3.1 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa

Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis, se cargaron 5 μ L del producto de PCR más 1 μ L de buffer de carga 6X en un gel de agarosa al 2%, junto con un marcador de peso molecular adecuado (escalera genómica de 100 pb) para verificar el tamaño de la banda obtenida. La electroforesis se realizó a 90 volts por un tiempo aproximado de una hora. El buffer obtenido para preparar el gel como para llenar la cámara de electroforesis fue TBE 1X, 25 μ L de bromuro de etidio (1 mg/mL) fueron adicionados a 100 mL de agarosa. El gel se observó en el aparato EDAS 290 a través del programa computacional Kodak 1D. 3.2.4

3.2.4 Detección del virus de papiloma humano tipo 16 por PCR

Las 62 muestras de CECB fueron amplificadas por PCR con los oligonucleótidos universales MY09/MY11 por Gabriela Anaya Saavedra como parte de su proyecto de doctorado. los cuales amplifican una región del gen L1 de VPH de al menos 25 tipos de virales de alto y bajo riesgo. Para verificar la presencia de VPH-16, las 27 muestras que fueron positivas para algún tipo de VPH con los oligos MY se sometieron a PCR con oligonucleótidos específicos del VPH-16 que amplifican una región de 506 pb del gen E6.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: después de 10 minutos de desnaturalización a 94°C, se realizaron 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de alineamiento 50°C por 30 segundos, extensión 72°C por 1 minuto. Con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

3.2.5 Determinación del estado de metilación del DNA del VPH-16 en CECB

3.2.5.1 Líneas celulares como control

Para el presente estudio se utilizó DNA de las líneas celulares SiHa y CaSki provenientes de CaCU, que contienen dos y 500 copias del VPH-16, respectivamente. Con ambas líneas se estandarizó la técnica de análisis de metilación ya que fungieron como controles negativos y positivos de modificación de DNA, respectivamente.

3.2.5.2 Modificación de DNA con bisulfito de sodio

Para determinar la frecuencia de metilación se utilizó la técnica de bisulfito de sodio, con la cual se es capaz de mapear los residuos de citosina metilados y no metilados.⁴² El método de bisulfito de sodio el cual potencia la desaminación de citosina no metiladas para convertirlas en uracilo. La 5mC es resistente a la desaminación inducida por el bisulfito debido al impedimento estérico del grupo

metilo en el C5. El producto de la reacción de 5mC es el uracilo, el cual después de amplificarse por PCR en la primera ronda de amplificación se aparea con la adenina (A) y en la segunda ronda de amplificación la A se aparea con la Timina (T). De tal forma que las citosinas no metiladas se observan como T, mientras que las 5mC se observan como C después de la reacción de secuenciación. Se modificó el DNA con el estuche *EZ DNA Methylation gold kit*, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, el cual modifica el DNA con el reactivo de bisulfito de sodio. El protocolo a seguir fue el siguiente:

Se trataron de 100 a 2000 ng de DNA en un volumen total de 45 μ L, y se desnaturalizaron con 5 μ L de NaOH 3M a 37°C por 15 minutos. Después de la desnaturalización, se adicionaron 100 μ L de Reactivo de Conversión CT (bisulfito de sodio e hidroquinona) a las muestras y se incubaron en oscuridad a 56°C de 12-16 horas. La reacción se detuvo al incubar la muestra en hielo por 10 minutos.

Para limpiar y eliminar los residuos de bisulfito, cada muestra se pasó por una columna de desulfonación, la cual elimina varios pasos de precipitación de DNA, minimizando su progresiva pérdida durante el tratamiento de limpieza, adicionando 400 μ L de M-binding Buffer a la muestra y pasándola a través de una columna. Se centrifugó 30 segundos a 14000 rpm, se adicionaron 200 μ L de Wash Buffer (etanol al 70%) a la columna y se centrifugó durante 30 segundos en las mismas condiciones. Se adicionaron 200 μ L de buffer de desulfonación-M, se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron 30 segundos. Posteriormente el DNA se lavó para eliminar los residuos de sales dos veces con buffer Wash. Finalmente el DNA modificado se eluyó en 50 μ L de buffer de elusión EB.

3.2.5.3 Diseño de oligonucleótidos *msp*

El bisulfito además de modificar el DNA no metilado, también introduce rupturas en el DNA, por lo tanto es imposible amplificar por PCR con eficiencia amplias regiones de DNA que excedan algunos cientos de pares de bases. Debido

a esta limitante, se tuvo que fraccionar la región de interés de 2498 pb (L2, L1 y LCR) con siete juegos de oligonucleótidos que incluyeron las posiciones 5594 a la 115, la cual contiene 35 CpGs.

Los oligonucleótidos *msp* (del inglés *methylation sensitive PCR*) para amplificar el DNA modificado fueron diseñados de acuerdo a la secuencia de referencia del HPV-16R (Los Álamos Nacional Laboratory, <http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/> mediante la conversión de todos los residuos de citosina en uracilo. La secuencia de los oligonucleótidos hibridan con secuencias adyacentes a los CpG, por lo tanto amplifican meCpGs CpGs, pero en ambos casos con DNA correctamente modificado.

Para la descripción de la región analizada se dividió en dos regiones. La primera comprende el extremo 3' del gen L1 y la LCR, la cual se amplificó con tres juegos de oligonucleótidos *msp*. En la Tabla 2 y Figura 11 se muestran la región que amplifican, el nombre de los oligonucleótidos, la posición genómica, la secuencia de los mismos y la distribución de 19 CpGs que están dentro de esta región.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos *msp* que amplifican el extremo 3' del gen L1 y la LCR del genoma de VPH-16

Se observa el nombre de la región que amplifican tres juegos de oligos, el nombre de los mismos, así como la posición genómica que amplifican y la secuencia nucleotídica de cada par.

Región	Nombre de oligonucleótidos <i>msp</i>	Posición genómica	Secuencia
3' gen L1 y 5' LCR	16 <i>msp</i> 3F	7049-7078	5-AAGTAGGATTGAAGGTTAAATTTAAAAT TTA-3
	16 <i>msp</i> 3R	7590-7560	5-AAACAACAATACAAATCAAAAAA CAAAAA-3
Potenciador	16 <i>msp</i> 4F	7465-7493	5-TATGTTT TTTGGTATAAAATGTGTTTTT-3
	16 <i>msp</i> 7R	7732-7703	5-TAAATTAA TTTAAACAACCAAAAATATAT-3
Promotor	16 <i>msp</i> 5F	7748-7777	5-TAAGGTTTAAATTTTAAAGGTTAATTAAT-3
	16 <i>msp</i> 8R	7748-115	5-ATCCTAAAACATTAC AATTCTCTTTTAATA-3

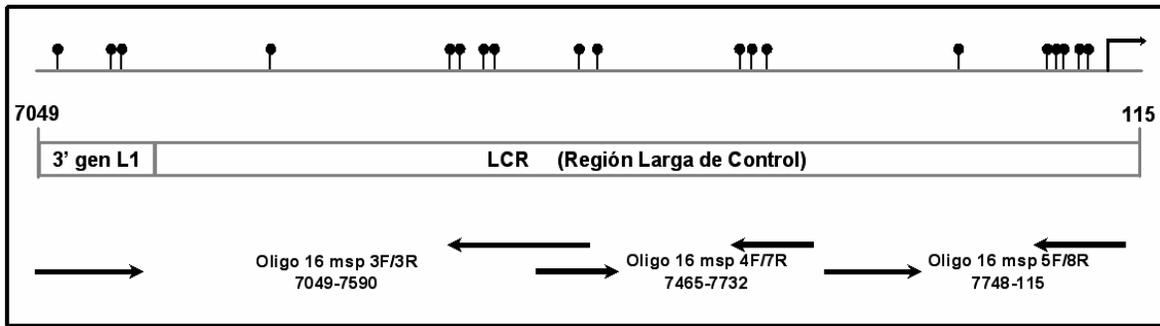


Figura 1. Productos de los pares de oligonucleótidos msp en relación a los sitios CpGs del 3' de L1 y la LCR

Se observa la región de 915 pb que cubre la LCR y 3' del gen L1, los círculos negros representan un sitio CpG. Se muestra los pares de oligos 16 msp 5F/16 msp 8R que amplifican seis CpGs en el promotor, el par 16 msp 4F/16 msp 7R que amplifican cinco CpGs que están en el *enhancer* y el par 16 msp 3F/16 msp 3R que amplifican ocho CpGs, cinco del extremo 5' de la LCR y tres del extremo 3' del gen L1

La segunda región comprende el extremo 3' del gen L2 y el resto del gen L1, dentro de la cual está el sitio de *splicing* de los genes L2 y L1, se amplificó con cuatro juegos de oligonucleótidos. En la Tabla 3 y Figura 12 se muestran la región que amplifican, el nombre de los oligos, la posición genómica y la distribución de los CpG.

Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos msp (*methylation sensitive PCR*) que amplifican el gen L1 y extremo 3' del gen L2 del genoma de VPH-16

Se observa el nombre de la región que amplifican tres juegos de oligos, el nombre de los mismos, así como la posición genómica que amplifican. Se muestra la posición genómica de los oligos 16 msp 21F/16 msp 15R, la secuencia de los tres juegos restantes no se muestra.

Región	Nombre de oligonucleótidos msp	Posición genómica	Secuencia
Sitio de <i>splicing</i> L1/L2	16 msp 21F 16 msp 15R	5554-5574 5831-5853	5-GT TGATGTAGGTGATTTTTA-3 5-ATACCCTAT ATTATAATCCTAAT-3
Gen L1	16msp BF 16msp BR	5927 -5063	Secuencia no disponible
Gen L1	16msp 1F y 16 msp 1R	6367-6581	Secuencia no disponible
Gen L1	16msp 2F y 16 msp 2R	6650- 7034	Secuencia no disponible

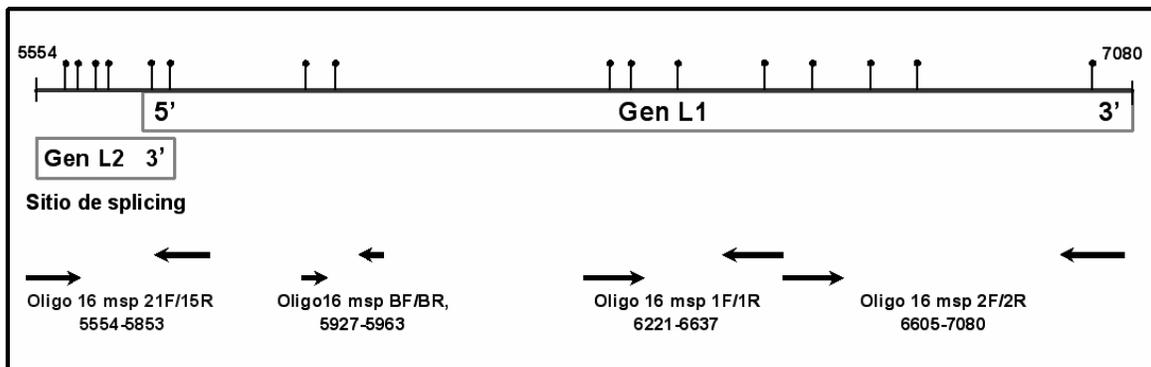


Figura 2 Productos de los pares de oligonucleótidos *msp* en relación a los sitios CpGs del extremo 3' del gen L2 y el gen L1 del genoma de VPH-16

Se muestra la región de 1526 pb que abarca el extremo 3' del gen L2 y el gen L1. Cada círculo negro representa un sitio CpG. Se observa el juego de oligos 16 *msp* 21F/16 *msp* 15R que amplifican cuatro CpGs en la zona de *splicing* y dos CpGs del 5' del gen L1, el par 16 *msp* BF/16 *msp* BR que amplifican dos CpGs de L1, el par 16 *msp* 1F/16 *msp* 1R que amplifican cuatro CpGs de L1 y finalmente el par 16 *msp* 2F/16 *msp* 2R que amplifican cuatro CpGs también del gen L1.

3.2.5.4 Amplificación por PCR del DNA modificado

Se realizaron ensayos de los oligos *msp* con DNA control de CaSki y SiHa modificado y no modificado. La PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L conteniendo 0.2 mM de cada uno de los 4 dNTPs, 10 pMol de cada uno de los oligos, 2 mM de $MgCl_2$ y 1 U de la enzima *Ampli Taq Gold* (Perkin-Elmer). La PCR se inició a 94°C por 10 minutos, seguida por 44 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 53°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto, con una extensión final de 68°C por 7 minutos. La presencia de los productos se verificó por electroforesis, cargando 10 μ L de cada producto de PCR en un gel de agarosa al 2% y observados en un transiluminador con luz ultravioleta.

3.2.5.5 Clonación y Transformación de los productos amplificados

La clonación de los productos de PCR se realizó con el estuche comercial *TOPO TA cloning*, de *Invitrogen*, el cual contiene el vector linearizado y con extremos cohesivos en el cual sobresale una T unida covalentemente a una topoisomerasa que cataliza la ligación del producto de PCR en forma eficiente y

rápida al vector debido a que éste contiene extremos cohesivos en los que sobresale una A que fue adicionada por la polimerasa *Taq Gold* en la reacción de amplificación del DNA modificado.

El protocolo es el siguiente: en un tubo se colocó 1 µL de agua estéril, luego 1 µL del vector *pCR R4-TOPO* y finalmente se adicionaron 3 µL del producto de PCR. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, se adicionaron 15 µL de células químicamente competentes TOP10, en seguida se incubó por 30 minutos más en hielo. Posteriormente a las bacterias se les dio un choque térmico a 40°C en baño de agua por 40 segundos, en seguida se colocaron los tubos otra vez en hielo por un minuto. Luego se adicionaron 100 µL de medio enriquecido SOC y se incubó por 1 hora a 37°C con agitación constante a 275 rpm. Después del tiempo de incubación se plaquearon las bacterias en cajas petri conteniendo agar LB y antibiótico kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron por 18 horas a 37°C.

3.2.5.6 PCR de colonia

La selección de las clonas positivas fue por amplificación del producto clonado por PCR de colonia con los oligos universales M13F (5-GTAAAACGACG GCCAG-3), y M13R (5-CAGGAAACAGCTATGAC-3). La mezcla de reacción fue en un volumen final de 20 µL, conteniendo 1X del buffer de reacción, 0.2 mM de cada uno de los 4 dNTPs, 10 pMol de cada uno de los oligos, 2 mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerasa, el DNA templado fue la colonia, de la cual se tomó una pequeña cantidad con la punta de un palillo y se disolvió en la mezcla de reacción. La amplificación se realizó en 30 ciclos (cada uno constando de un paso de desnaturalización 94°C por 30 segundos, seguidos de una temperatura de alineamiento a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos), con un paso de desnaturalización a 94°C por 7 minutos, y otro de extensión final a 72°C por 7 minutos. La presencia de los productos fue verificada por electroforesis

cargando 10 μL de producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta.

3.2.5.7 Limpieza de los productos de PCR de colonia

Los productos amplificados de las clonas positivas se purificaron con el método de *SAP-EXO-1* como se menciona; en un tubo se agregó 9.5 μL del producto de PCR de colonia, 1 μL del buffer *10X SAP*, 1 μL de *SAP* y 0.5 μL de *Exo I*. La mezcla de reacción se incubó por 1 hora a 37°C, posteriormente se inactivó la enzima a 72°C por 30 minutos y enseguida se guardó el producto purificado a 4°C.

3.2.5.8 Reacción de secuencia

Los productos purificados se sometieron a reacción de secuenciación con el estuche comercial *Abi Prism Big Dye terminador cycle secuencing v3.1*. La reacción consistió en 2 μL del buffer de reacción (5X), 2 μL del oligo M13 F (0.8 pMol/ μL), 1.5 μL del terminador, 2 μL de agua, 2 μL del producto amplificado, todo en un volumen final de 10 μL . La reacción se sometió a un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 24 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos.

3.2.5.9 Purificación de los productos de la reacción de secuencia

Para purificar los productos de PCR de los componentes de la reacción de PCR de secuencia, se precipitó el producto de PCR en una mezcla conteniendo 3 μL de acetato de sodio 3M [pH 4.6], 62.5 μL de etanol desnaturalizado al 95% y 14.5 μL de agua por 10 μL de muestra. Se mezclaron y agitaron en vortex los componentes anteriores y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Acto seguido la mezcla se centrifugó 20 minutos a 14 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 250 μL de etanol al 70% por 5 minutos a

14000 rpm, posteriormente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire. Por último, ésta se resuspendió en 20 µL de formamida *Hi-Di* y la reacción de secuencia fue analizada en un secuenciador automatizado.

3.2.5.10 Análisis de secuencias y determinación del patrón de metilación

Las secuencias y sus respectivos cromatogramas se analizaron por los programas computacionales *Chromas versión 2.31* y *Clustalw* vía Internet. La secuencia de referencia utilizada fue la del HPV-16R (*Los Alamos National Laboratory*, <http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>), en donde todas las citosinas a excepción de las meCpGs, se convirtieron a timinas y por comparación de secuencia, las meCpGs se pudieron detectar.

Capítulo IV

Resultados

4.1 El virus de papiloma humano tipo 16 predominó en CECB

Con el objeto de conocer la frecuencia de VPH-16 en la población de estudio, se realizó PCR tipo específica. La frecuencia para cualquier tipo de VPH fue de 43.5% (27/62 casos). El VPH tipo 16 fue el más frecuente de todos los tipos de VPH encontrados 55.5% (15/27 casos). En la Figura 13 panel A, se muestra la amplificación del gen E6 específico para VPH tipo16 de cinco muestras de CECB, evidenciado por una banda de 503 pb. En el panel B se muestra el control de calidad de DNA, en este caso un gen de expresión invariable de beta-globina, evidenciado por una banda de 280 pb.

Este estudio incluyó doce casos de CECB y cuatro controles, los cuales se tipificaron para VPH tipo 16, la calidad del DNA se verificó con el gen beta-globina.

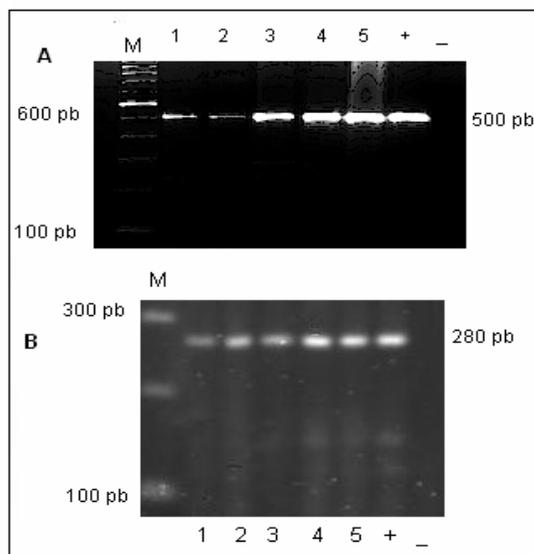


Figura 1. Presencia del gen E6 de VPH tipo 16 en cinco casos de CECB

Foto de dos geles de agarosa que muestran en A) amplificación del gen E6 de VPH-16, evidenciado por la banda de 503 pb. En B) control de calidad de DNA, evidenciado por una banda de 280 pb que revela la amplificación del gen β -globina. En ambos casos los carriles del 1 al 5 son

diferentes muestras con CECB, el carril 6 es un control positivo (SiHa) y el carril 7 es un control negativo, M es el marcador de tamaño molecular de DNA.

4.2 Frecuencia de los tipos de VPH detectados en CECB

La prevalencia de diferentes tipos de VPH detectados en CECB se muestra en la Tabla 4. Se detectó la presencia para cualquier tipo de VPH en 27/62 (43.5 %) pacientes con CECB. De los positivos a VPH, en 22 casos (81%) se determinó la presencia de VPH de alto riesgo (tipos 16, 18 y 33) y en cinco casos (19 %) VPH de bajo riesgo (tipos 2, 11, 13, 32 y 35).

Se detectaron ocho genotipos de VPH, dentro de los de alto riesgo el tipo 16 fue el más frecuente (55.5%), seguido del tipo 18 (18.5%) y finalmente el tipo 33 se detectó en dos muestras (7.5%). Se detectaron cinco tipos de VPH de bajo riesgo en cinco casos, la frecuencia en cada caso es de 3.7% y dentro de los tipos detectados esta el 2, 11, 13, 32 y 35.

En conclusión se detectó cualquier tipo de VPH en el 43.5% de la población objeto de este estudio, y el tipo viral más frecuente fue el VPH tipo 16 (55.5%), estos datos correlacionan con los encontrados en otros estudios.

Tabla 1 Prevalencia de diferentes tipos de VPH en 27 de 62 muestras de CECB

<i>VPH</i>		
<i>Negativos</i>	35	
<i>Positivos</i>	27	100%
<i>Tipos</i>		
2	1	3.7%
11	1	3.7%
13	1	3.7%
16	15	55.5%
18	5	18.5%
32	1	3.7%
33	2	7.4%
35	1	3.7%
Total	N=62	VPH (%)

4.3 Diseño del estudio para el análisis de metilación

Este estudio se realizó con el fin de determinar si hay una posible asociación en la frecuencia de metilación que correlacionen con la carcinogénesis de la cavidad bucal, y determinar si el VPH en boca también es blanco de metilación como se ha mostrado en sitios anogenitales. Así como de ampliar investigaciones previas sobre la metilación de VPH-16, las cuales se han reportado en la región anogenital, donde el VPH tiene una relación causal evidente.

Debido a que la metilación de sitios CpGs no se puede determinar por secuenciación directa, se utilizó el método de bisulfito con el cual se es capaz de inferir la proporción de CpGs metilados y no metilados, después de clonar y secuenciar.⁴² Se realizó la modificación de DNA a partir de líneas celulares, muestras clínicas normales y con carcinoma, todas con VPH-16. La región de interés se amplificó con siete juegos de oligos.

La primera región amplificada y secuenciada es de 972 pb, que comprende la posición 7049 a la 115, en la cual hay 19 sitios CpGs (Figura 14). De izquierda a derecha, tres CpGs se localizan en el extremo 3' del gen L1, cinco en el extremo 5'

de la LCR, cinco más en el *enhancer*, uno en el origen de replicación y finalmente cinco en el promotor. Con el fin de obtener datos representativos de la frecuencia de metilación, se analizaron diez clonas de cada muestra para cada uno de los siete segmentos analizados, los cuales constituyen el estado de metilación de diez moléculas diferentes no continuas.

Se encontró que la región 3'L1/5'LCR en CECB estaba hipermetilada por arriba del 40%, muy similar a lo reportado en carcinomas de la zona anogenital.^{73,131,144} Donde se propone como probable marcador de progresión neoplásica.¹³²

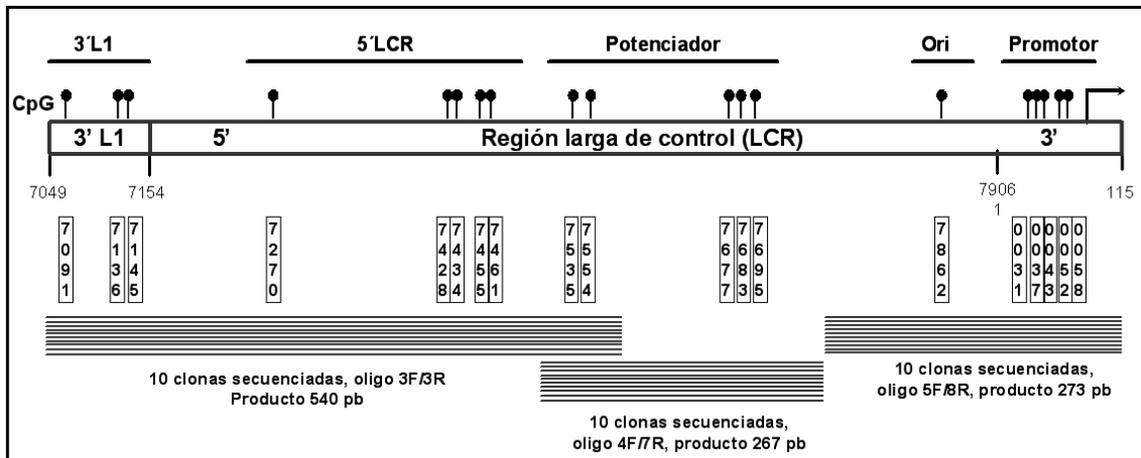
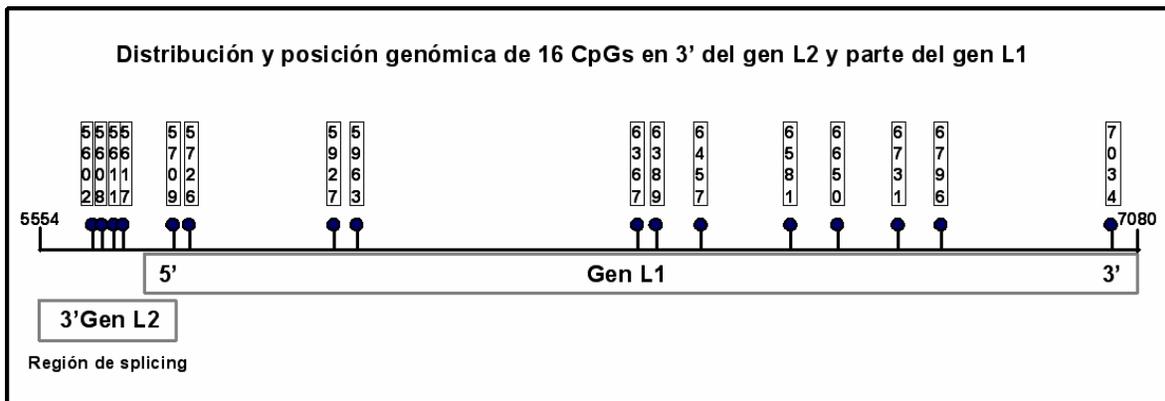


Figura 2. Distribución genómica de 19 CpGs en la LCR y 3' de L1 del VPH-16

Segmento genómico de 972 pb que comprende la LCR y el extremo 3' del gen L1. Se observa la posición genómica de cada uno de los 19 CpGs; tres CpGs corresponden al 3' L1 (7091, 7136 y 7145), cinco al segmento 5' del LCR (7270 a 7461), cinco al *enhancer* (7535 a 7695), uno al origen de replicación (7862) y cinco al promotor p97 (31 a 58). Se muestran la región que amplifican tres juegos de oligos; (3F/3R, 4F/7R y 5F/8R), así como el tamaño del producto amplificado, las 10 líneas horizontales representan las clonas amplificadas y secuenciadas de cada región de las doce biopsias de CECB, muestras control y controles de líneas celulares analizadas.

La segunda región analizada se llevó a cabo con la finalidad de ampliar investigaciones previas sobre la metilación de los CpGs en el DNA de VPH-16 hacia ésta región del genoma de VPH-16 la cual no ha sido explorada. El análisis incluye la frecuencia de metilación del gen L1 y el extremo 3' del gen L2, dentro del cual está el sitio de *splicing* L2^L1. La región de interés se fraccionó con cuatro juegos de oligonucleótidos que incluyeron las posiciones 5554 a 7080, la cual

contiene 16 CpGs, y que analiza un segmento de de 1526 pb. En la Figura 15 se observa la distribución y nombre de los oligonucleótidos, así como la distribución de los CpGs. cuatro de estos 16 CpGs (5602, 5608, 5611, 5617) son del sitio de splicing entre el gen L2 y el gen L1. Los restantes 12 CpGs son del segmento restante del gen L1 (5709 a 7034).



4.3.1 Los oligonucleótidos *msp* sólo amplifican DNA modificado

Durante el análisis de las muestras se incluyeron como controles negativos y positivos de metilación, DNA de las líneas celulares SiHa y CaSki, las cuales contienen una y 500 copias de VPH-16, respectivamente. SiHa no esta metilada en el *enhancer* y promotor, mientras que CaSki tiene un patrón de metilación heterogéneo.⁷³

Con el objeto de determinar los patrones de metilación en las líneas celulares SiHa y CaSki se modificó el DNA con el reactivo de bisulfito y con la finalidad de corroborar que los oligos *msp* sólo amplifican DNA modificado y estandarizar las condiciones de modificación, se realizaron ensayos de los oligos *msp* con DNA control de SiHa y CaSki modificado y no modificado. En la Figura 16 se muestra la fotografía de la región que incluye el 3'L1/5'LCR, el *enhancer*, y el promotor, que se amplificó por PCR con los oligos 16 *msp*3F/3R, 16 *msp* 4F/7R, 16 *MSP* 5F/8R, respectivamente. La presencia de una banda de 540 pb, 240 pb y 270 pb indica la amplificación de la respectiva región. Mientras que la esperada ausencia de banda en los otros carriles en donde se utilizo DNA no modificado corrobora que los oligos *msp* sólo amplifican DNA modificado.

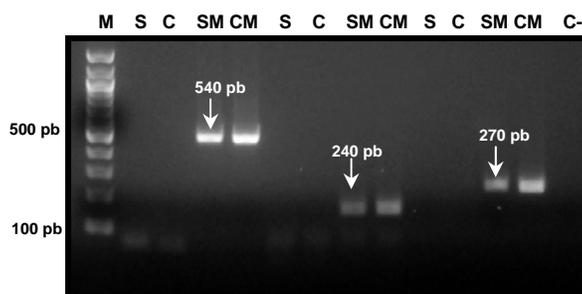


Figura 4. Amplificación de DNA modificado de la región LCR y parte de L1 con oligos *msp*

Se muestra la fotografía de un gel de agarosa en donde se observa que el DNA no modificado de SiHa (S) y CaSki (C) no se amplificó con los oligos *msp*, mientras que el DNA modificado de SiHa (SM) y CaSki (CM) amplificaron con los diferentes juegos de oligos de la LCR y 3' de L1, la banda

de 540 pb se amplificó con el par 16 msp 3F/16 msp 3R (región 3'L1/5'LCR), la banda de 240 pb se amplificó con el par 16 msp 4F/16 msp 7R (región del *enhancer*), la banda de 270 pb se amplificó con el par 16 msp 5F/16 msp 8R (región del promotor).

4.3.2 Clonación y análisis de secuencias

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR del DNA modificado, se clonaron en el vector TOPO T/A y posteriormente se transformaron en bacterias de *Escherichia coli*. El análisis de las clonas positivas fue por PCR de colonia, con el fin de obtener datos representativos de la frecuencia de metilación, se seleccionaron aleatoriamente y analizaron diez clonas de cada muestra para cada región amplificada. En La Figura 17 se muestra la presencia de los productos de PCR clonados del promotor y de la región 3'L1/5'LCR, evidenciado por una banda de 435 pb y otra de 705 pb, respectivamente.

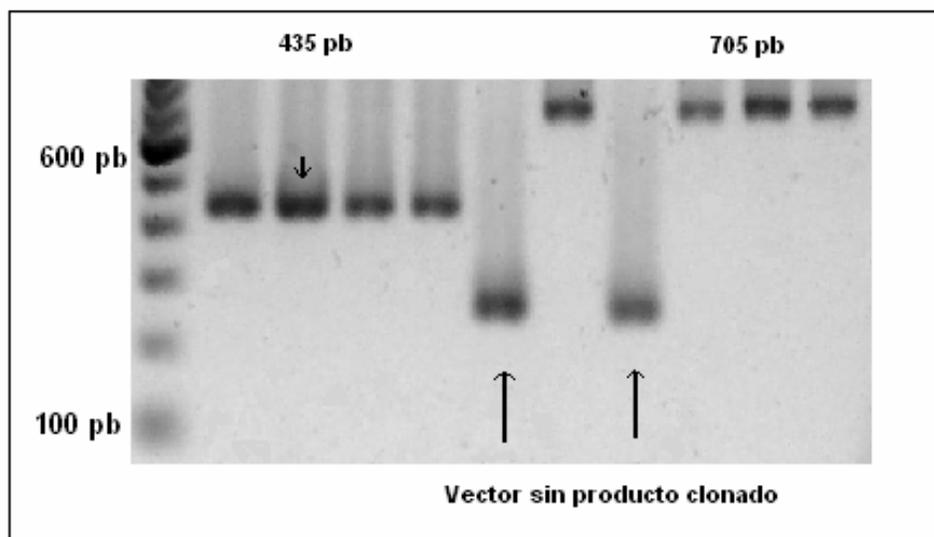


Figura 5. El promotor y la región 3' de L1/5' de la LCR en la línea celular CaSki fueron clonadas

Se muestra una fotografía de un gel de agarosa en donde se observan las clonas positivas, cuatro bandas de 435 pb que corresponden a la región del promotor, otras cuatro bandas de 705 pares de bases que corresponden a la región 3'L1/5'LCR, las dos bandas de 200 pb es el vector sin producto clonado.

Una vez que se corroboró que los productos clonados eran los deseados, se procedió a secuenciarlos. Los cromatogramas obtenidos después de la reacción de secuencia se observan en la Figura 18, en el panel A se muestra el cromatograma del promotor y en el panel B una parte de la región 3' LCR. Para determinar el estado de metilación, la secuencia original del VPH-16R y el cromatograma experimental se analizaron vía internet con los programas *chromas* versión 2.31 y *clustalw*. Al realizar el alineamiento se observa que si el residuo de C estaba metilado se conserva como una C, mientras que si estaba no metilado se observa una T. En el cromatograma del panel A se observa que los residuos CpG estaban metilados ya que se observan como CpG. Mientras que en el panel B, los CpG están no metilados ya que se observan como TpG.

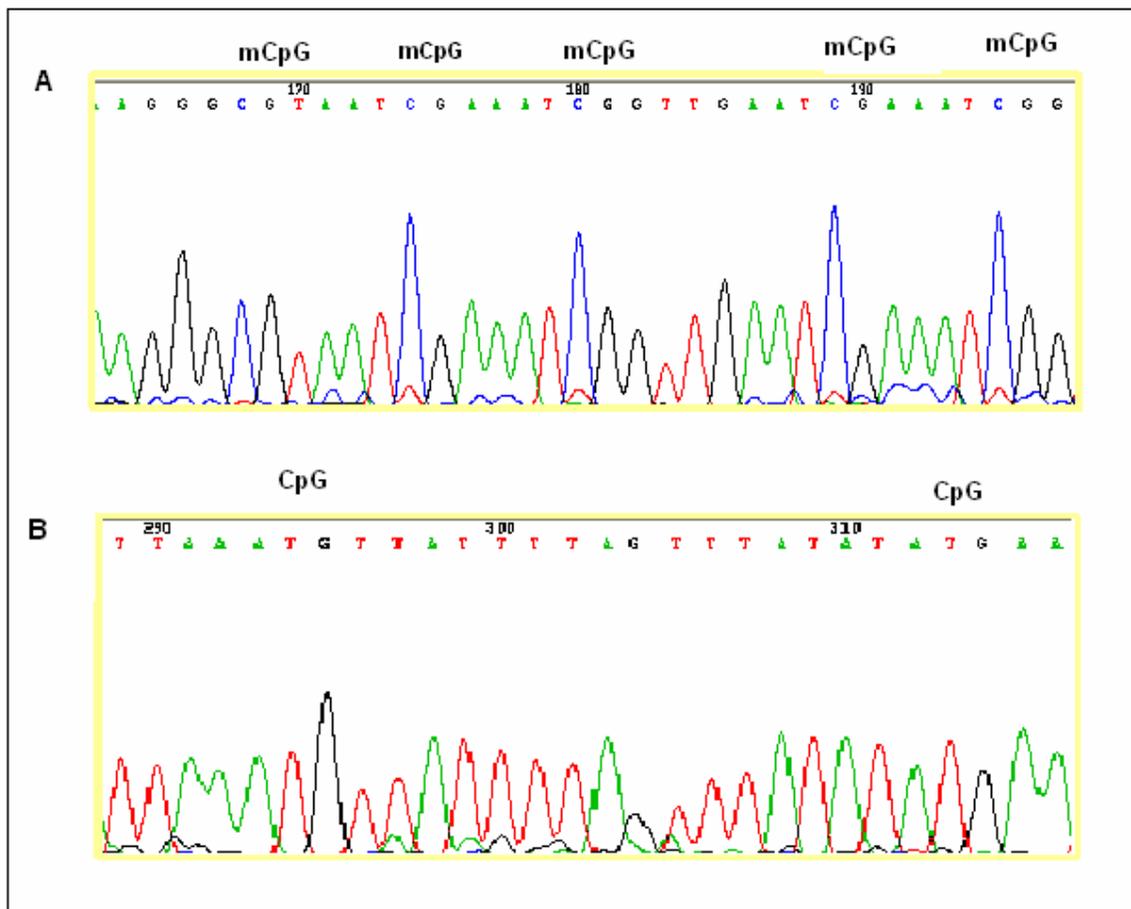


Figura 6. Secuencia de DNA con CpGs metiladas y no metiladas

Se muestra dos cromatogramas después de secuenciar el DNA modificado y clonado de CaSki en A) se observa que cinco sitios CpGs del promotor están metiladas (mCpG) ya que se observan como CG, en B) se observan dos sitios CpG no metilados ya que se observan como TpG.

4.4 Diferente patrón de metilación en las líneas celulares SiHa y CaSki

4.4.1 Hipermetilación y no metilación de la línea celular SiHa

El análisis de la línea celular SiHa se usó como control negativo en la reacción de modificación de DNA. Esta línea celular tiene de una a dos copias del genoma de VPH-16 integrado dentro del genoma celular, y se encuentra no

metilada en el *enhancer* y promotor.^{7,73} Sin embargo, el análisis detallado de la región 3' del gen L1 y 5' de la LCR no se ha reportado, en la Figura 19 se muestra el análisis de cinco clonas individuales, se observa que todas las clonas mostraron el mismo patrón de metilación, ninguna de las cinco clonas estuvo metilada en los 16 CpGs que están en la LCR, mientras que los tres CpGs de la región 3' del gen L1 estuvieron metiladas en las cinco clonas analizadas.

Previos reportes muestran que la hipermetilación de la LCR de VPH-16 correlaciona con represión transcripcional,¹⁰⁹ estos datos muestran que el patrón de no metilación en la LCR correlaciona con un promotor y un *enhancer* transcripcionalmente activo, ya que las dos únicas copias de SiHa tienen que permanecer no metiladas para estar transcripcionalmente activas.^{7 136 137} Mientras que la hipermetilación en el extremo 3' del gen L1 se ha sugerido que es una huella del estado carcinogénico, en el que el genoma viral está integrado, y que probablemente se asocia con inactivación transcripcional del gen L1.^{131,132}

De acuerdo a los resultados mostrados y dado que la línea celular SiHa tiene una o dos copias del VPH-16, se concluye que el genoma de VPH-16 tiene un patrón de metilación homogéneo, no metilado en la LCR para permanecer transcripcionalmente activa e hipermetilación en la región 3' del gen L1.

3' Gen L1		Región larga de control (LCR)																								
		5' LCR							Enhancer					Promotor												
Oligo 3/3									Oligo 4/7					Oligo 5/8												
7091	7136	7145	7270	7428	7434	7455	7461	7535	7554	7677	7683	7695	7862	31	37	43	52	58								
CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG								

Figura 7. No metilación en la LCR e hipermetilación en 3' de L1 de la línea celular SiHa

Se muestra la metilación o ausencia de metilación en 19 sitios CpGs de la región 3' del gen L1 y LCR de VPH-16 de cinco clonas independientes provenientes de la línea celular SiHa, el número de la parte superior representa la posición del CpG en el genoma de VPH-16. Las CpGs no

metiladas son los rectángulos blancos y los metilados son los rectángulos negros. Los dos separadores blancos verticales indican los límites entre los amplicones, y las discontinuadas entre las moléculas del VPH 16 supuestamente diferentes.

4.4.2 Heterogeneidad en el patrón de metilación en la línea celular CaSki

El análisis de la línea celular CaSki se usó como control positivo en la reacción de modificación de DNA. Se observó un conservado patrón de metilación en las mismas posiciones ya reportadas por *Kalantari y cols*⁷³ en la región LCR y parte del 3' del gen L1, excepto una región del enhancer analizada, la cual se encontró no metilada en ninguno de los cinco sitios, este dato sugiere que la región del *enhancer* esta transcripcionalmente activa. En la Figura 20 se observa el análisis de 10 clonas individuales, se observa que ninguna de las 10 clonas fue completamente metilada, sino que cada copia contenía entre uno y seis (de las 19) CpGs no metiladas. Ninguna de las 10 clonas estuvo metilada en la posición 7270, y la metilación fue poco frecuente en las posiciones 7091, 7535, 7554 y 7862. De acuerdo a los resultados mostrados y dado que las células de CaSki contienen 500 copias del VPH-16, se concluye que los genomas de estos no están homogéneamente metilados, pero que hay diferencias entre cada uno de ellos, ya que se observa un conservado patrón de hipo e hipermetilación en diferentes CpGs.

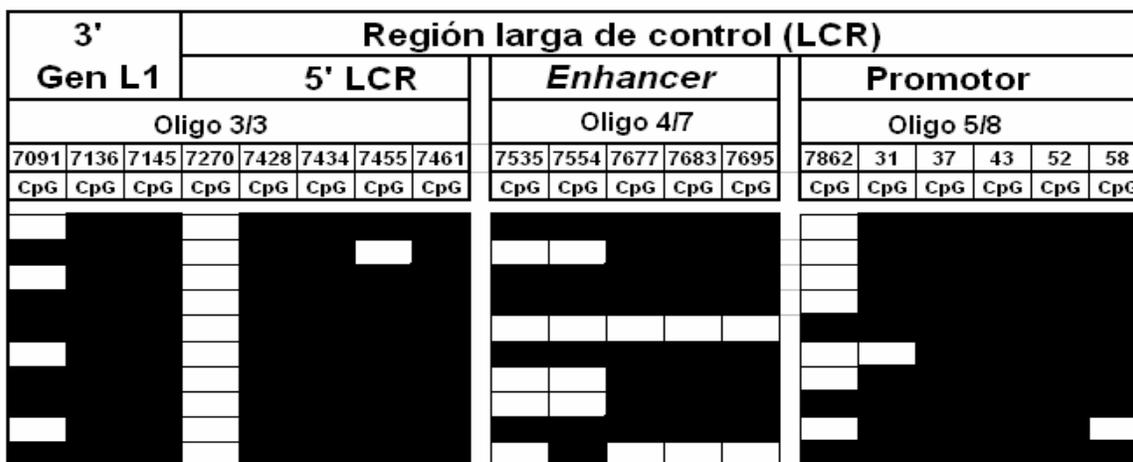


Figura 8. Heterogeneidad en la metilación de la línea celular CaSki

Figura 9. No metilación de la LCR en infecciones asintómaticas

Se puede observar la carencia de metilación de los 19 sitios CpG de la LCR en VPH-16 de cinco clonas independientes, para este grupo control solo fue posible amplificar la región completa de la LCR en dos muestras, y para otras dos muestras se presenta la región del enhancer. La U significa "no metilado"

4.6 Metilación en casos con CECB**4.6.1 La mayoría de las muestras de CECB se amplificaron exitosamente**

De doce casos de CECB incluidos en este estudio se amplificaron con éxito para la primera región descrita arriba, algunas muestras no tuvieron suficiente DNA para el análisis del segundo segmento de L2/L1. En general, la mayoría de las muestras se amplificaron con siete juegos de oligos, siendo la región de L1 donde no se pudo completar el análisis en algunas zonas de algunas muestras.

En la Figura 22 panel A, se muestra la amplificación de DNA modificado de nueve muestras con los oligos 16 msp 5F/16 msp 8R que amplifican al promotor, evidenciado por la presencia de una banda de 270 pb, se muestra la amplificación de siete muestras (2-8), la muestras 1 y 9 fueron negativas. Posteriormente los productos se clonaron y transformaron en plásmidos de *E. coli*, la análisis de las clonas positivas fue por PCR de colonia, en el panel B de la Figura 22 se observa una banda de 435 pb que revela que la región fue clonada.

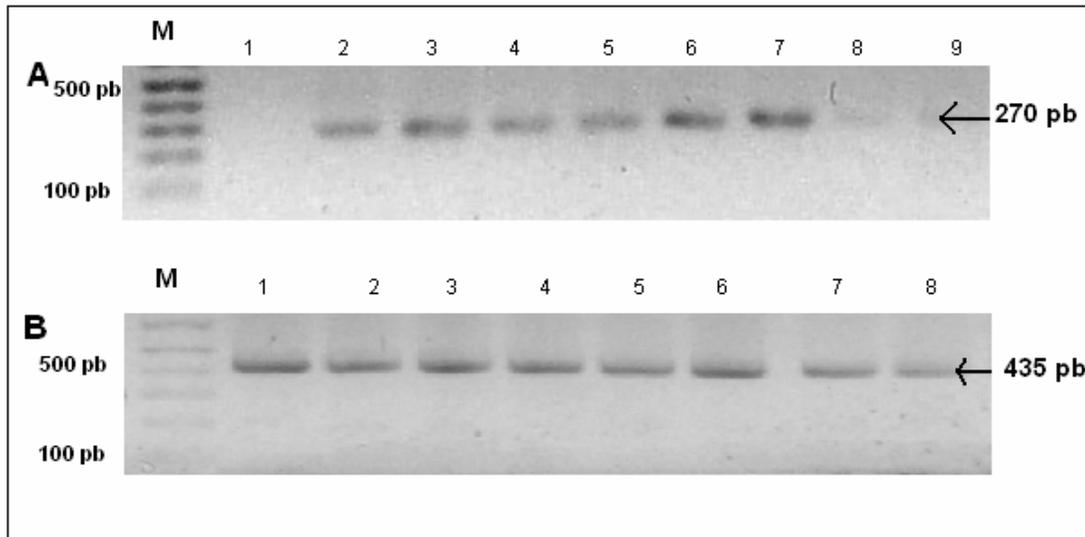


Figura 10. El promotor fue amplificado en la mayoría de las muestras de CECB

Se muestra la fotografía de dos geles de agarosa en A) las bandas de 270 pb muestra que la región del promotor de DNA modificado fue amplificada en siete de nueve muestras de CECB, en B) después de clonar uno de los productos de A, una banda de 435 pb muestra la clonación del promotor

4.6.2 No hubo correlación entre el consumo de tabaco, alcohol, y los patrones de metilación con CECB

A pesar de que el número pequeño de muestras analizadas, se realizó análisis estadístico, se construyó una base de datos en el programa SPSS v.10, a cada región analizada (por ejemplo 3'L1/5'LCR, *enhancer* y promotor) se le asignaron 3 valores: hipermetilado, hipometilado y no metilado. No se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre los patrones de metilación de DNA de VPH-16 de doce casos de CECB con el sitio anatómico, género, estadio clínico, consumo de tabaco y alcohol que nos permita inferir alguna asociación.

4.6.3 Diferentes frecuencia de metilación de 35 CpGs del gen L1 y LCR en CECB

Se analizó la frecuencia de metilación de 35 CpGs que abarcan el extremo 3' del gen L2, el gen L1 y la LCR de VPH-16 de doce casos de CECB. Se analizaron en total 3693 residuos CpG derivados de 706 clonas amplificadas con siete juegos de oligos, en la Figura 23 se observa la distribución dimensional de 35 CpGs, cuatro CpGs están en el extremo 3' del gen L2, 15 CpGs se encuentran en el gen L1 y 16 están dentro de la LCR.

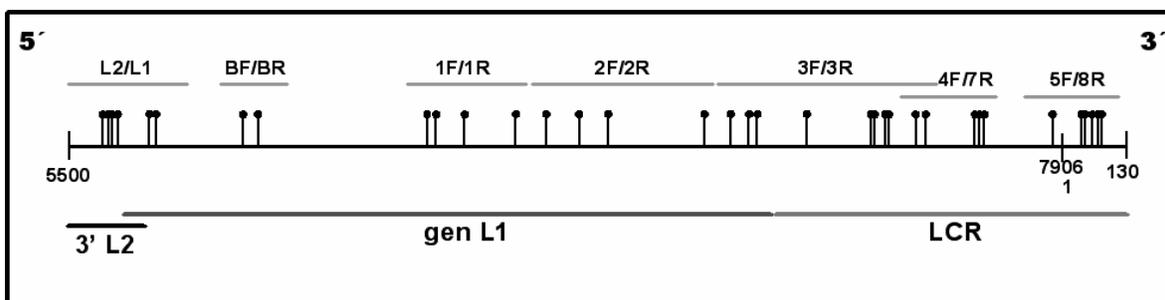


Figura 11. Productos de los pares de oligonucleótidos *msp* en relación a los 35 CpGs del extremo 3' del gen L2 y el gen L1 del genoma de VPH-16

Se muestran 35 CpGs que están dentro de la LCR, el gen L1 y parte del gen L2, cuatro CpGs están dentro del extremo 3' del gen L2, 15 dentro del gen L1 y 16 de la LCR. La línea negra vertical con el círculo negro representa un CpG, la representación de cada CpG es dimensional, se observa el nombre y la región que amplifican los siete juegos de oligos 16 *msp*.

En general, de los 3693 sitios CpG analizados, 949 estaban metilados, es decir 25.7%. Se observó un patrón de hiper, hipometilación y no metilación con diferente frecuencia en la región analizada, lo que significa que los CpGs de L2, L1 y la LCR de VPH-16 son blanco de la maquinaria de metilación de DNA en células del epitelio de la cavidad bucal. No obstante, los datos apuntan a diferencias y probabilidad de que cada sitio se metile. En la Figura 24 se muestra la frecuencia de metilación de los 35 CpGs analizados.

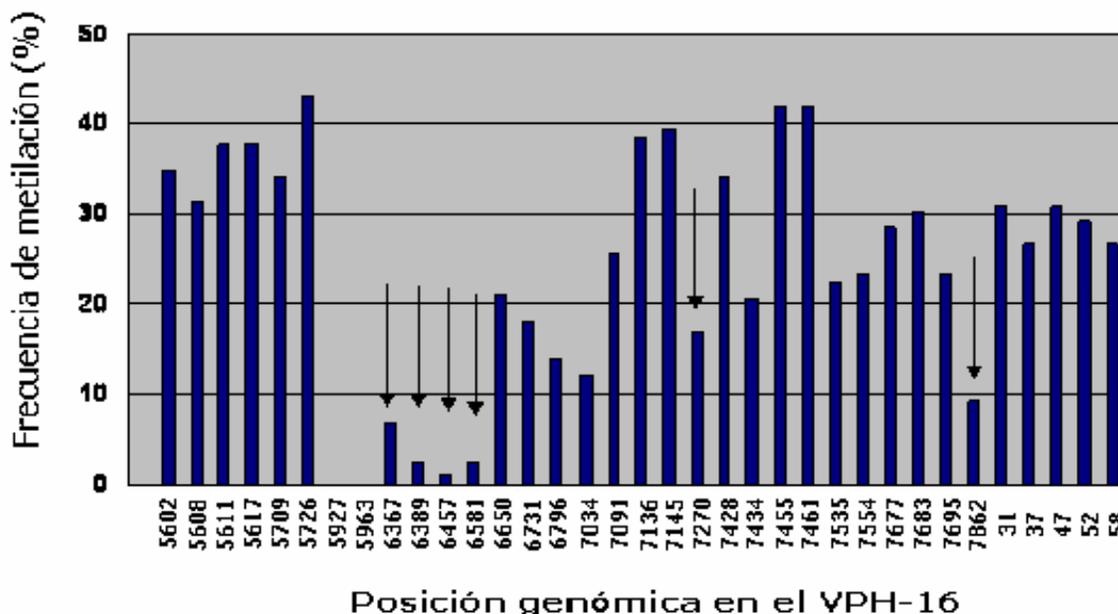


Figura 12. Frecuencia de metilación en 35 CpGs del gen L1 y LCR de VPH-16 en CECB

Las barras muestran los resultados obtenidos a partir de 10 clonas independientes derivadas de cada una de las 12 muestras clínicas analizadas. Las flechas indican los sitios donde se detectó menor frecuencia de metilación.

4.6.4 Regiones de hipermetilación en CECB

Las regiones donde se encontró hipermetilación fue la región de el promotor, el *enhancer*, la región 3'L1/5'LCR y de región de *splicing* L2^L1. El promotor se encontró hipermetilado en tres (25%) de doce muestras, el *enhancer* estuvo hipermetilado en cuatro (33%) de doce muestras, la región 3L1/5LCR presentó hipermetilación heterogénea en diez (83.3%) de doce muestras, y finalmente la zona de *splicing* se encontró hipermetilada homogéneamente en cuatro (36%) de once casos. A continuación se describe brevemente la frecuencia de metilación de cada sitio.

4.6.4.1 La metilación del *enhancer* y promotor de VPH 16 en CECB

El *enhancer* y el promotor de al menos un genoma de VPH-16 en lesiones precancerosas y carcinomas debe permanecer desmetilado para mantener la transcripción activa de los oncogenes E6 y E7. Por ejemplo la línea celular SiHa, contiene una o dos copias del genoma de VPH-16, las cuales están no metiladas y son transcripcionalmente activos. Sin embargo, la mayoría de los carcinomas contienen muchos, algunas veces cientos de copias de VPH-16, como es el caso de la línea celular CaSki, en la cual la mayoría de las copias virales están metiladas, posiblemente como resultado de sus arreglos en *tandem*. Por consecuencia, esas copias están transcripcionalmente silenciadas, mientras que la expresión continua de oncogenes ocurre sólo a partir de una copia viral.^{7,136} Como consecuencia de este panorama, la metilación del *enhancer* y el promotor de VPH-16 en la mayoría de muestras clínicas es un indicador del proceso carcinogénico en la célula infectada.

La región del *enhancer* contiene cinco CpGs distribuidos desde la posición 7535 hasta la 7695. De los doce carcinomas bucales examinados, el 33% (cuatro) estuvo hipermetilado, mientras que el 76% (ocho) estuvo metilado eventualmente en uno o dos sitios, los cuatro casos hipermetilados fueron; C7, C8, C11, y C12 y casi desmetilado en las ocho muestras restantes Figura 25.

El segmento del promotor contiene 6 CpGs distribuidos desde la posición 7862 hasta la 58. El CpG de la posición 7862 es parte de sitio de unión a E2 en el origen de replicación viral, los otros cinco sitios CpG ubicados en la posición 31 al 58 son parte de sitios de unión de *Sp1* y E2 del promotor (p97). En la Figura 25 se observa que la región del promotor está casi completamente metiladas en tres de doce (25%) muestras con CECB (C8, C11, y C12), un patrón que solo se ha observado en lesiones de alto grado y carcinomas del tracto anogenital.

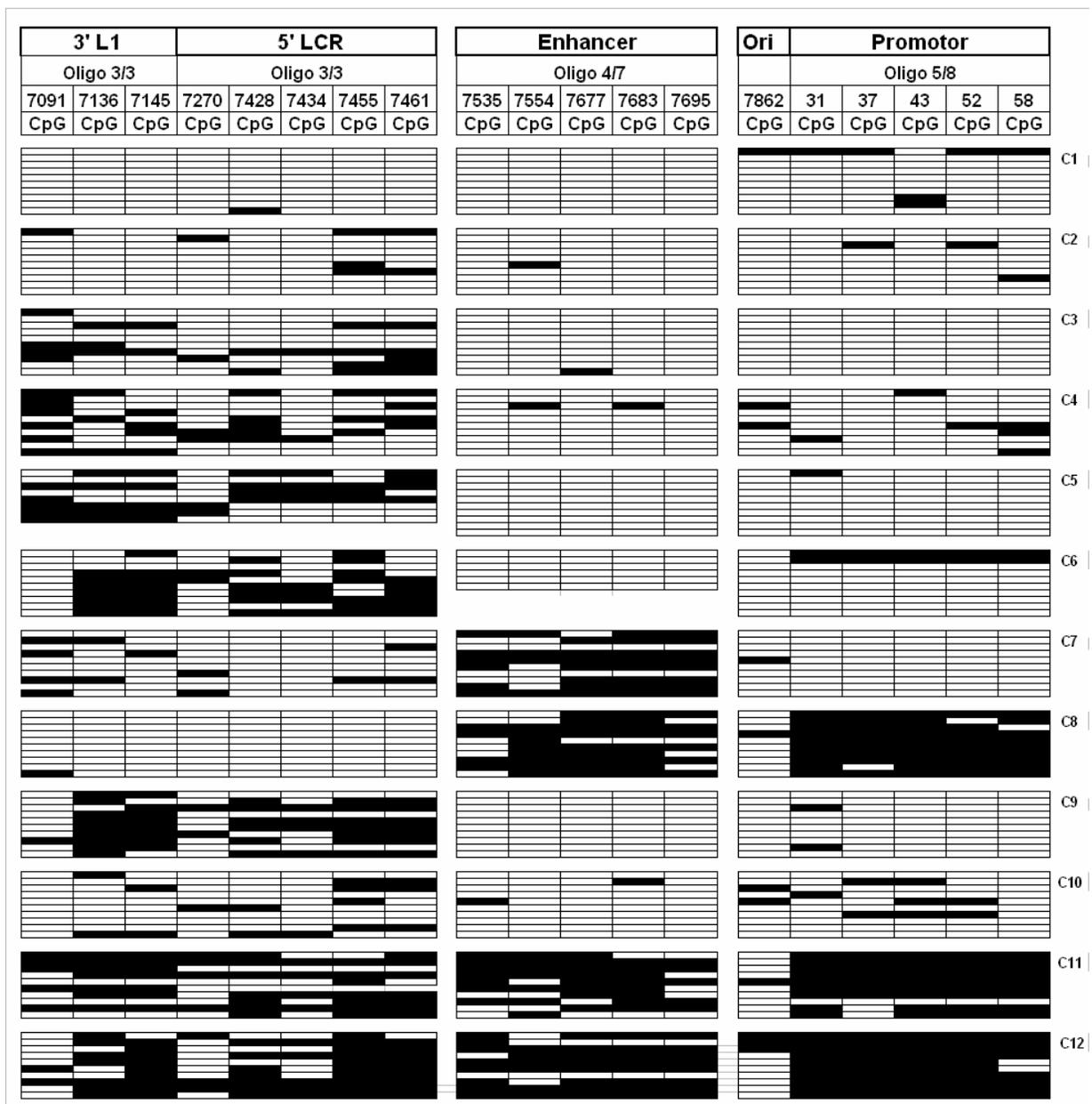


Figura 13. Heterogeneidad en la metilación de la región 3' de L1 y LCR de VPH 16 de CECB

Se muestra la metilación o ausencia de metilación en 19 sitios CpGs de la región 3' del gen L1 y LCR de VPH-16 de 10 clonas independientes derivadas de cada una de 12 muestras con carcinoma bucal. Los rectángulos horizontales blancos representan CpGs no metilados, los rectángulos negros representan meCpG, Cada grupo de 10 líneas horizontales representa 10 clonas que proceden del mismo paciente. Los dos separadores blancos verticales indican los límites entre los amplicones. La ausencia de rectángulos indican clonas que fueron parcialmente o no analizadas debido a la poca cantidad de DNA. En general se muestra el estado de metilación de 1886 dinucleótidos CpG en 354 clonas analizadas. La leyenda de la derecha corresponde al número de carcinoma.

Es importante señalar que la posición 7862 forma parte del origen de replicación y estuvo hipometilada (9% de metilación), un fenómeno que ha sido reportado en carcinomas y cuyo significado no ha sido explicado.^{73,144}

En general la frecuencia de metilación fue de 28.8% para los cinco CpG del promotor en CECB, excediendo a lo reportado en CaCU e idéntico a lo encontrado en lesiones de alto grado de la región anal (18 y 28%, respectivamente), mientras que la proporción de metilación en infecciones asintomáticas y lesiones anogenitales de bajo grado ha sido de uno o dos ordenes de magnitud mas bajo.

4.6.4.2 Las regiones 3' del gen L1 y 5' de la LCR de CECB se encuentran hipermetiladas

Dentro de este segmento hay 8 CpGs, tres del extremo 3' del gen L1 (7091, 7136 y 7145) y cinco del extremo 5' de la LCR (7270-7461). Esos ocho CpGs se encontraron no metilados en las muestras asintomáticas de la cavidad bucal,

No obstante, de los doce carcinomas analizados se observó que la frecuencia de metilación en los 3 CpGs que están en L1 fue de 26, 38, y 39%, respectivamente (Figura 24 y Figura 25), este resultado se aproxima a la frecuencia de metilación observada en CaCU (43-54%). Mientras que en dos muestras (C1 y C8) se observaron muchas moléculas de DNA no metiladas, en donde la frecuencia de metilación fue tan sólo del 1.25%. Sin embargo, en las diez muestras restantes se observó una sustancial metilación en las moléculas analizadas, cuya frecuencia de metilación va desde el 8 al 36%. El promedio de metilación en todos los CpGs de este segmento fue máximo en las muestras C5, C6, C9, C11, y C12 (50, 52, 55, 63 y 65%, respectivamente), lo cual excede la frecuencia de metilación reportada en muchos carcinomas de la región genital.

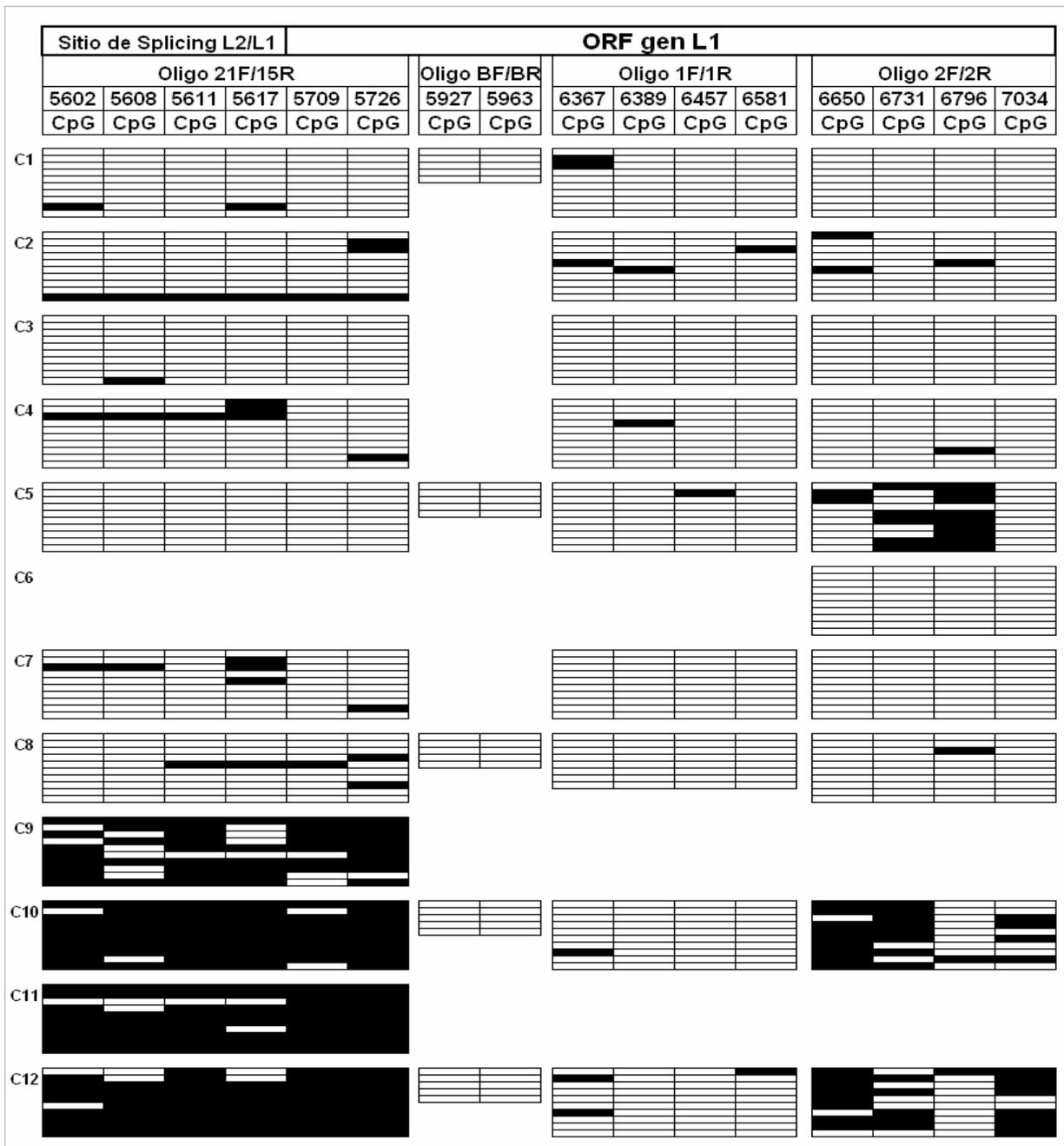


Figura 14. Heterogeneidad en la metilación del gen L1 de VPH 16 en biopsias de CECB

Se muestra la metilación o ausencia de metilación en 16 CpGs del gen L1 de VPH-16 de 10 clonas independientes provenientes de cada una de las 12 muestras con carcinoma bucal. Los rectángulos horizontales blancos representan sitios CpGs no metilados, mientras que los rectángulos negros representan sitios meCpG. Cada grupo de 10 líneas horizontales representa 10 clonas derivadas del mismo paciente. Las columnas superiores indican la amplificación con diferentes juegos de oligos. La ausencia de rectángulos indican clonas que fueron parcialmente o no analizadas debido a la pequeña cantidad de DNA en la muestra. En conjunto se muestra el

estado de metilación de 1807 CpG en 323 clonas analizadas. La leyenda de la izquierda corresponde al número de carcinoma.

4.6.4.3 La zona de *splicing* de L2/L1 presento hipermetilación homogénea

Se encontró hipermetilación homogénea en la zona L2/L1 en cuatro de once (36%). A continuación se describe brevemente la frecuencia de metilación de cada sitio. En general los sitios que están dentro de esta zona presentaron metilación del 31 al 43%.

En el extremo 5' de L1 hay dos CpGs (5709, 5706), que junto con los CpGs que se encuentran en la zona de *splicing* (5602, 5608, 5611, 5617) fueron consistentemente hipermetilados entre el 73 y 90% en cada una de las cuatro muestras hipermetiladas, estos valores son tan altos y consistentes a los reportados para VPH-18 en el extremo 3' de L1.^{132,131}

4.6.5 La región media del gen L1 y el segmento internucleosomal de la LCR estuvieron hipometiladas en CECB

Algunas muestras de CECB no tuvieron suficiente DNA para el análisis de todo el segmento del gen L1 tal como se observa en la Figura 26. Hubo dos sitios en el gen L1, el 5927 y 5963 los cuales estuvieron no metilados, de esta región se analizaron cinco casos (C1, C2, C8, C10 y C12) de CECB. Se encontraron cuatro sitios donde la metilación fue mínima, en las posiciones 6367, 6389, 6457 y 6581 (7, 2, 1 y 2%, respectivamente).

Es decir, la región comprendida entre la posición 5927 hasta la 6581 muestran ningún sitio metilado ó eventualmente pueden mostrar de uno a 3 sitios metilados en algunas muestras.

Las posiciones que se encontraron hipometiladas dentro de la LCR, entre ellas la 7270, 7554 y 7862 coinciden con las 3 posiciones no metiladas detectadas en la LCR de la línea celular CaSki, estas CpG coinciden con el linker nucleosomal que une los nucleosomas del enhancer y el promotor. En las Figura 25 y Figura 26 se visualiza la metilación o ausencia de ésta para cada uno de los 3693 sitios CpG evaluados en CECB, en la Figura 25 muestra la frecuencia de metilación en la

región LCR, mientras que la Figura 26 muestra la distribución de metilación del gen L1.

El tamaño de la muestra analizada en este estudio es pequeña, debido a que el CECB ocupa el lugar número doce en frecuencia de todas las neoplasias a nivel nacional y que el VPH-16 tuvo una frecuencia del 24.1% en la población estudiada. Además, estas muestras fueron colectadas desde el 2003 hasta el 2006. Para el análisis de la LCR y parte de L1 se analizaron todas las muestras, no así para la región para la segunda parte del análisis que abarca el gen L1 desde la posición 5602 hasta 7034.

Capítulo V

Discusión

En este trabajo se analizó al VPH-16 en dos contextos clínicos; en i) infecciones asintomáticas que es cuando el virus se replica y produce viriones y ii) en cáncer, contexto en que el virus no se replica y suele integrarse al DNA de la célula hospedera. Se analizó el estado de metilación de 35 CpGs del extremo 3' del gen L2, el gen L1 y la LCR de VPH-16 en cuatro muestras control y doce pacientes con carcinoma de células escamosas de la cavidad bucal con diferente estadio clínico e histopatológico del tumor.

En general, se reporta la frecuencia de metilación de 3,693 sitios CpGs analizados, de los cuales 949 (25.7%) estuvieron metilados en CECB, mientras que no se observó metilación en los controles asintomáticos. Estos datos confirman que los genomas de VPH-16 son blanco de la maquinaria de metilación de las células del epitelio de la cavidad bucal, lo cual origina varias preguntas a cerca del mecanismo de éste fenómeno y de las consecuencias biológicas de éste sobre la célula epitelial y/o el ciclo de vida del VPH-16.

En general la hipometilación o ausencia de metilación en regiones reguladoras correlaciona con expresión génica; por lo tanto, la carencia de metilación observada en los controles de este estudio correlaciona con incremento transcripcional de los oncogenes a un nivel basal necesario para inducir a la célula a entrar a la fase de síntesis y permitir al virus completar el ciclo viral.

Estudios preliminares, sugieren que la metilación del DNA viral es importante en el ciclo de vida normal del VPH, posiblemente por silenciamiento transcripcional en células basales y/o por inducción a latencia,^{76,73} debido a que el *enhancer* de VPH-16 se encuentra hipermetilado en células basales, donde el DNA viral se mantiene a muy bajos niveles. Por otro lado, algunos virus como EBV,⁹⁴ HIV⁶⁶ y HTLV-1.⁷⁹ utilizan la metilación de su genoma para permanecer en estado latente y evadir la respuesta inmune.

Durante el ciclo productivo la LCR está hipermetilada en células basales, cuando la célula entra al proceso de diferenciación la LCR se empieza a desmetilar progresivamente, de tal forma que en las células del estrato superior se encuentra hipo o no metilada para permitir la expresión de los oncogenes, sin embargo, en la etapa de diferenciación terminal la expresión de éstos se reprime por la proteína E2, la cual es sensible a metilación en su secuencia de reconocimiento, por lo tanto la hipometilación favorece la expresión de los oncogenes, pero a cierto nivel ya que cuando la concentración de E2 es suficiente, ésta se une al promotor y apaga la expresión de los oncogenes.⁷⁶

En las células basales la transcripción viral se mantiene a su mínimo debido a al exceso de los represores YY1, CDP y a la hipermetilación de la LCR. Durante la diferenciación del epitelio la concentración de YY1, CDP y el nivel de metilación disminuye, mientras que la concentración del activador transcripcional de la LCR; AP1 incrementa, lo cual favorece la transcripción de los oncogenes. De tal forma que la diferenciación epitelial, la concentración de represores, activadores y cambios en la metilación, activan al silenciador y al *enhancer* secuencialmente, permitiendo bajos niveles de expresión en células basales y la estimulación transcripcional en células en proceso de diferenciación.^{13,74}

En general los genomas episomales que son productivos ya sea de virus o derivados de DNA celular, conservan un patrón de hipometilación o carencia de ésta, tal como se ha reportado en episomas del virus SV40 y DNA celular que cuando se integra en viriones de adenovirus.^{32,33}

Diversos factores se asocian al desarrollo de cáncer en el humano; uno de ellos es la infección con cierto tipo de virus de DNA y RNA, los cuales pueden se pueden integrar al genoma celular y causar interrupción de éste por rearrreglos cromosómicos y mutaciones por inserción, las cuales pueden inducir el desarrollo de un carcinoma. Por otro lado, la célula como mecanismo de defensa induce metilación *de novo* del genoma viral que ha sido integrado para silenciar la expresión génica del mismo.⁹² Sin embargo algunos virus contrarrestan la

metilación del DNA y toman ventaja de ello para regular la expresión génica viral. Por ejemplo el virus Epstein Bar (EBV).⁹⁴

Por otro lado, la metilación del DNA puede ser importante durante la infección viral y la transformación celular.^{91,19} Es decir, la metilación no sólo pudiera asociarse con silenciamiento transcripcional del virus, sino también inducir silenciamiento transcripcional por hipermetilación de genes celulares que regulan la homeostasis celular. Este mecanismo de silenciamiento probablemente es inducido por el propio virus el cual activa o induce la actividad transcripcional de DNMT1 a la cual dirige para inducir hipermetilación aberrante de genes celulares. Por ejemplo se ha observado que el oncogen LMP1 de EBV silencia al gen supresor de metástasis E-caderina por inducción de DNMT1, los oncogenes del poliomavirus humano BK y la proteína E1A de adenovirus 5 inducen la actividad transcripcional de DNMT1 a través de su interacción con la proteína Rb.⁹¹ Además, la proteína E7 de VPH-16 se une y activa a la DNMT1 *in vitro* e *in vivo*.¹⁹ A este respecto se ha mostrado que el virus de hepatitis B, EBV, SV40 y el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) inducen silenciamiento transcripcional de genes como RASSF1A, p16, GST e Interferón gamma (IFN- γ), respectivamente en tumores asociados a estos virus⁸³

Así mismo el virus EBV utiliza la metilación de su genoma para permanecer latente, y posteriormente desmetilarse e inducir expresión diferencial de sus genes así como del propio huésped y consecuentemente inducir carcinogénesis.⁹⁴ Sin embargo, en la infección viral por VPH-AR se desconoce si el virus utiliza la metilación del DNA para permanecer latente, aunque hay evidencia experimental de que el VPH-16 incrementa la actividad transcripcional de DNMT1.¹⁹ Por eso, es de gran importancia el análisis de metilación de DNA de genes celulares y virales, debido a que esta modificación epigenética influye en la conformación de la cromatina a través de metilación, acetilación y desacetilación de histonas.^{16,43} Como se comentó la metilación es importante en la biología de muchos virus, tal como SV40 que en forma episomal se encuentra hipo o no metilado, pero al

integrarse a la célula hospedera es blanco de la maquinaria de metilación celular.³² En general un DNA viral que se inserta en el genoma celular es silenciado por hipermetilación, tal como EBV,⁹⁴ HIV y retrovirus endógenos.³²

Los virus de papiloma humano tipo 16 y 18 no son la excepción ya que al ser integrados en el genoma celular durante la carcinogénesis son metilados en patrones distintos.^{76,73,136,6,144} y se ha propuesto su posible uso como marcador de progresión neoplásica,¹³² La integración de VPH es una condición para la transformación celular, ya que es una forma de fijarse al cromosoma y asegurar la continua expresión de los oncogenes E6 y E7, esto trae consecuencias graves ya que con la integración se pierde al gen E2, el cual regula negativamente la expresión de los oncogenes.

En este estudio se analizó la frecuencia de metilación del extremo 3' del gen L2, el gen L1 y LCR en pacientes con CECB, en los cuales se observó un patrón de hiper e hipometilación con diferente frecuencia.

De manera general, se puede concluir que hay muchas dudas en lo que a metilación del DNA de VPH-16 respecta, es decir, no hay sitios que permanentemente están hiper o hipometilados de CpGs.

Sin embargo, se conserva un patrón de hipo e hipermetilación en diferentes sitios de las regiones analizadas. Por ejemplo, se encontró una profunda y consistente hipometilación en la región media del gen L1 (posiciones 6367, 6389, 6457 y 6581), también se encontró una hipometilación de 9.2% en la posición 7862, la cual corresponde al origen de replicación y se cree que tiene que permanecer hipometilado para permitir la replicación viral y permitir la producción de viriones. Además cerca del CpG 7862 esta el sitio de unión a Sp1, que esta altamente conservado entre los papilomavirus. Por otro lado, se ha reportado que Sp1 impide la metilación de elementos adyacentes,¹⁷ quizás la hipometilación de 7862 es favorecida por Sp1 para mantener la replicación viral activa.

El promotor se encontró hipermetilado en 28.7%, este segmento contiene cinco sitios susceptibles de ser metilados, cuatro corresponden a la proteína E2,¹³⁰ la cual es sensible a metilación y uno al activador Sp1 cuya unión no está influenciada por la metilación del DNA,⁵⁴ El promotor está organizado en un nucleosoma, cuyo estado de metilación y acetilación afecta su actividad transcripcional.^{121,122}

Estudios previos sugieren que el DNA de VPH-16 tiende a estar hipermetilado en el *core* de nucleosomas y no metilado o hipometilado en las uniones internucleosomales.⁷³ La hipermetilación del promotor y la hipometilación de 7862 correlaciona con lo encontrado en la LCR de VPH-16, por ejemplo los sitios internucleosomales 7862, 7535 y 7554 se encontraron hipometilada en el 9, 22 y 23%, respectivamente. Esta frecuencia es más elevada que la encontrada en CaCU la cuál fue de 3, 12 y 13%, respectivamente.⁷³

Se había reportado que la posición 7270 nunca se encontraba metilada,⁷³ sin embargo, en este estudio se reportó una frecuencia de metilación del 17%, esta posición también es parte de un internucleosomal. Quizás esta hipo e hipermetilación localizadas entre la unión nucleosomal y los nucleosomas, respectivamente tenga un significado funcional, sí se considera que el DNA internucleosomal es libre del metilación CpG.¹⁰⁴

Las regiones hipermetiladas a nivel global fueron la del promotor, el *enhancer*, la región 3'L1/5'LCR y la región de *splicing* de los genes L1 y L2, la hipermetilación reportada fue de 28.7%, 25.5%, 34.6% y 36.4% respectivamente. Las primeras tres regiones corresponden al *core* de nucleosomas y donde es más frecuente encontrar hipermetilación. También hubo hipermetilación en la región de *splicing*, sin embargo, no se sabe si corresponde a un nucleosoma.

La hipermetilación en la región de *splicing* fue la más alta (36.4%) y más homogénea que a la observada en las regiones. Por ejemplo, los sitios de *splicing* presentaron metilación del 31 al 43%, mientras que para el extremo 3' de L1 y 5' LCR fue del 34 a 42%, y de alrededor de 20 y 30% para la mayoría de los sitios del *enhancer* y promotor.

La región del *splicing* fue la de mayor metilación en cada muestra, ya que el perfil de hipermetilación de cada muestra fue de 73, 93, 90 y 90% de metilación, (C9, C10, C11 y C12, respectivamente), es decir, muestran un patrón de hipermetilación homogéneo, muy alto llegando a ser casi 90%. La hipermetilación 5'L1/L2 es muy específica y sólo ciertas muestras lo tienen a diferencia de los observado en 3' de L1 en donde es menos frecuente y mas heterogénea. El patrón de hipermetilación en L1/L2 es muy parecido a lo observado a 3' L1 de VPH-18 con respecto a que es muy consistente entre muestras. Estos datos muestran que en VPH-16 asociado a CECB es más homogénea la hipermetilación en 5' que en 3' de L1. Una explicación a la hipermetilación del gen L1 puede ser que ya no se transcribe después de que se ha integrado en los carcinomas. De éstas observaciones surge la pregunta si la hipermetilación de la zona de *splicing* es reprimir la transcripción de los genes tardíos?, ó que el resultado de esta hipermetilación sea alterar el proceso de *splicing*?, ó la hipermetilación de la zona de *splicing* podría predecir con más exactitud la integración del genoma viral?, quedan muchas preguntas por responder a cerca de la probable función que pueda tener la hipermetilación la zona de *splicing* con respecto a la integración del genoma viral, así como en la transcripción de los genes tardíos y la probable función en la participación del procesamiento y *splicing* de los transcritos tardíos.

Es importante destacar que de la zona de *splicing* no hay reportes previos respecto a la metilación en ningún tipo de carcinoma relacionado con VPH-16. Por lo que no se sabe el significado funcional que pudiera tener en el ciclo de vida normal o en la carcinogénesis.

La hipermetilación en VPH-16 presuntamente integrados al genoma celular en cáncer se interpreta como una confirmación de la "hipótesis de defensa del genoma", basada en la hipermetilación de retrovirus y transgenes integrados cromosomalmente¹⁴ y en los estudios iniciales de metilación adenovirales transfectados y sus blancos cromosomales.^{33,123} Está aceptado ampliamente que el VPH-16, la mayoría de las veces se encuentra integrado en la etapa de cáncer²⁷ y por lo general las copias integradas son inactivadas por metilación, pero eso no

quiere decir que no haya genomas de VPH que estén transcripcionalmente activos. Un ejemplo es la línea celular CaSki la cual demuestra que los carcinomas a menudo contienen genomas de VPH integrados en tandem, mismos que son blancos de metilación celular. Así, mientras algunos de estos genomas permanecen hipermetilados y son transcripcionalmente inactivos,^{73,136} otros se encuentran desmetilados y transcripcionalmente activos para mantener la expresión continua de los oncogenes virales^{7, 136,137} También se ha reportado que la metilación de DNA integrado de líneas celulares de CaCU y de cáncer primario asociado a VPH reprime la transcripción del DNA viral y mantiene uno o dos centros transcripcionalmente activos por célula en regiones perinucleares.^{136,137}

Sin embargo, existe el ejemplo opuesto en el que si el número de copias integradas es muy bajo, estas no son metiladas ya que tienen que estar transcripcionalmente activas para mantener el fenotipo transformado, tal como se observa en la línea celular SiHa, la cual contiene dos copias virales integradas al genoma celular, las cuales se hallan no metiladas.^{7,73}

En este estudio se encontró que en diez (83%) de doce carcinomas de la cavidad bucal el VPH-16 estuvo hipermetilado en la LCR y gen L1 de manera semejante a los carcinomas y lesiones de alto grado reportadas en el tracto ano genital por el grupo del *Dr Bernard*, los cuales sugieren el uso de la metilación del DNA de VPH como posible biomarcador para caracterizar lesiones malignas. En la línea celular SiHa y algunas lesiones genitales de estudios hechos por *Kalantari y cols*⁷³ reportaron que esos patrones pueden ser suficientes pero no necesarios para un estado de malignidad, ya que algunos carcinomas contienen un solo genoma viral que debe permanecer desmetilado para contener una continua transcripción.

Estos hallazgos sugieren que probablemente el genoma viral se encuentra integrado en el genoma de la célula hospedera en carcinomas orales y que fueron afectados por la célula huésped de una forma semejante a lo que sucede en cáncer del tracto anogenital. Esta observación está fundamentada en ciertos patrones analizados en este estudio, por ejemplo, la hipometilación de la posición

7862 observada en todas las muestras, y la selectiva hipermetilación de la región del promotor en algunas muestras. Este hallazgo ha llegado a ser una constante en los patrones de metilación de VPH-16 en diferentes sitios anatómicos, y son propiedades evidentes del DNA viral independientemente del sitio anatómico de la célula huésped afectada. Estudios recientes han señalado que la metilación del promotor pudiera favorecer la carcinogénesis, debido a que se inhibe la unión de la proteína E2,^{130,15} la cual es un factor represor del promotor, y asegura la continua expresión de los oncogenes aún en la subpoblación de lesiones que no pierden E2 como consecuencia de interrupción genómica.⁵ Por lo tanto, el VPH-16 probablemente pudiera ser la causa etiológica en diez carcinomas bucales donde se encontró hipermetilación.

Por otro lado, es ampliamente aceptado que los principales agentes causales del cáncer de la cavidad bucal son el tabaco y el alcohol, los cuales justifican el 80% de los casos. Sin embargo, algunos CECB ni se asocian a tabaco y alcohol y diversos estudios sugirieron que el VPH podría tener una asociación causal en el 20% de los cánceres de cavidad bucal.^{48,59}

Por otro lado, los tumores asociados a tabaco y alcohol, VPH negativos tienen diferente perfil molecular, clínico y pronóstico que los VPH positivos (sin consumo de tabaco y alcohol). Por ejemplo los tumores asociados a tabaco y/o alcohol se relacionan con peor pronóstico debido a que generalmente se asocian con estadio IV (indicio de malignización, con probable invasión a nódulos linfáticos y hacen metástasis, los tumores asociados a VPH generalmente se asocian a estadios más tempranos y son de mejor pronóstico, estas diferencias apuntan que esos tumores son diferentes entidades clínicas y por lo tanto pudieran tener distinto origen etiológico.

A este respecto de los doce casos analizados en este estudio, cuatro presentaron consumo de tabaco y dos presentaron consumo moderado de alcohol, es decir la mayor parte de la población de estudio no consumía tabaco y/o alcohol. A los tumores que sólo tenían la presencia de VPH se asociaron a estadio I y III, los cuales son de mejor pronóstico que los de estadio cuatro. Los tumores

asociados a tabaco/alcohol/VPH en este estudio mostraron un estadio IV que es de peor pronóstico, cabe mencionar que uno de los cuatro pacientes con consumo de tabaco presentó metástasis. En general se observó que los tumores en los que sólo tenían la presencia de VPH se asociaron con un mejor estadio clínico, mientras que los asociados a tabaco y alcohol, mostraron un estadio más avanzado, incluso uno presentó metástasis, es decir, en este último grupo el VPH potenció probablemente el estadio del tumor. Mientras que los que no estaban asociados a tabaco presentaron un estadio I y III, en general el 67% de los tumores mostró estadio I y III mientras que el 33% mostró un estadio IV.

Por lo tanto en aquellos pacientes con CECB que no mostraron consumo de tabaco y alcohol, el VPH-16 pudiera haber sido el agente causal de la carcinogénesis, y en aquellos que mostraron consumo de tabaco y alcohol, quizás el VPH-16 pudo haber actuado como cofactor o cooperado sinérgicamente para la progresión carcinogénica.

Sin embargo es importante mencionar que la carcinogénesis es un conjunto de enfermedades, la cual tiene diversos factores de riesgo en los que se encuentran los factores genéticos, la presencia de factores ambientales, los hábitos del alimenticios, los hábitos de consumo de individuo y finalmente la infección con cierto tipo de virus, tal como los virus de papiloma humano de alto riesgo, los cuales tienen una causalidad evidente en el desarrollo de cáncer cervico uterino, sin embargo su función en la carcinogénesis de la cavidad bucal no es bien definida, Por lo tanto se necesitan más estudios que aporten evidencia a este respecto.

Capítulo VI

Conclusiones

- ✓ La frecuencia de VPH en la población de estudio fue alta (43,7%, n=62), y de éstos el VPH-16 en CECB fue el tipo predominante (55%).
- ✓ La no metilación de la LCR y gen L1 de VPH-16 en controles sanos se asocia con una infección productiva tal como se ha mostrado en infecciones por VPH-AR de la región anogenital y a lo reportado para viriones de SV40.
- ✓ La hipermetilación de la LCR, el gen L1 y parte de L2 de VPH-16 en CECB, evidencia que el virus es susceptible de ser metilado por la maquinaria de metilación de las células epiteliales de la cavidad bucal.
- ✓ La hipermetilación en el extremo 3' del gen L1 y la LCR de VPH-16 correlaciona con aquel encontrado en carcinomas de la región anogenital, sugiriendo que el VPH-16 pudiera relacionarse con la carcinogénesis de algunos casos de la cavidad bucal
- ✓ La hipermetilación de VPH-16 es típica y se asocia al proceso carcinogénico de diferentes tipos de epitelio infectados con VPH-16, incluso el CECB.
- ✓ La mayoría de los casos de CECB asociados a VPH-16 se asociaron con estadios más tempranos del tumor, los cuales son de mejor pronóstico, en éstos probablemente el VPH promovió la carcinogénesis.
- ✓ Los carcinomas asociados a VPH-16 que además consumían tabaco y alcohol se asociaron a estadios más avanzados del carcinoma, en estos casos el VPH probablemente potenció el proceso carcinogénico.

CONCLUSIONES

- ✓ Por lo tanto los datos sugieren que el VPH-16 tiene un papel importante en la carcinogénesis bucal.
- ✓ Sin embargo, son necesarios más estudios epidemiológicos y moleculares, para demostrar la causalidad del VPH en la carcinogénesis de la cavidad bucal.

Capítulo VII

Perspectivas

La detección de hipermetilación del extremo 3' del gen L1 en el 83% de los casos de CECB analizados sugiere que el genoma de VPH-16 estaba integrado al genoma celular, lo cual generalmente ocurre en el estado carcinogénico, resultado de la interrupción del gen E2 y consecuente expresión exacerbada de los oncogenes.

Bajo esta observación se propone detectar la expresión de transcritos de los oncogenes E6 y E7 en las muestras con carcinoma, aun con el *enhancer* y el promotor metilado, lo cual es de esperarse por el patrón de metilación y expresión de oncogenes de la línea celular CaSki, así como la detección del estado físico del virus y correlacionarlos con el estado de metilación del virus. Pero de acuerdo a lo observado en la línea celular SiHa, los genomas que mantuvieran unos cuantos números de copias tendrían la LCR no metilada, desde este punto de vista también es importante analizar el número de copias integradas.

Los datos de expresión activa del mRNA de los oncogenes, así como la integración viral, el número de copias y las datos de metilación en los casos de CECB y en los sitios de metástasis ayudaría a demostrar la causalidad del VPH en el proceso carcinogénico de cáncer bucal.

Sin embargo, en controles asintomáticos sin displasia o cáncer se esperaría nula o poca expresión de los transcritos de E6 y E7, ya que por lo general la expresión de éstos se correlaciona consistentemente con los diferentes estados físicos del VPH, es decir, hay un incremento en los niveles de expresión de éstos cuando el virus esta integrado al genoma celular en lesiones de alto grado y en cáncer de la región anogenital. Mientras que se observa una expresión muy baja o nula cuando se encuentra en forma de episoma lo cual correlaciona principalmente con una infección asintomática.

Capítulo VIII

Referencias

1. Ai W, Toussaint E, Roman A. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7 and E1 promoters. *J. Virol.* 1999; 73:4220-4229.
2. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer staging manual*, 5th Edition. Chicago: Lippincott Williams and Wilkins 1997.
3. Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear factor 1 and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J Virol.* 1993; 67:4455-4463.
4. Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with activation of the HPV-16 promoter. *Virology.* 1996; 224:281-291.
5. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 2006; 44:1755-62.
6. Badal S, Badal V, Calleja-Macias I, Kalantari M, Chuang L, Li B. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology.* 2004; 324:483-492.
7. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. 2003; 77:6227-6234.
8. Badaracco G, Venuti A, Morello R, Muller A, Marcante ML. Human papillomavirus in Head and Neck carcinomas: prevalence, physical status and relationships with clinical/pathological parameters. *Anticancer Res* 2000;20:1301-1305.
9. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 2002;98:440-445.
10. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997;31:493-525.
11. Baseman J, Koutsky L. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005; 32S: S16-S24.
12. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11:5694-5699.
13. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther.* 2002;7:219-237.
14. Bestor TH and Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. *Nat. Genet.* 1996; 12:363-367.
15. 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.
16. Bird A . The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8
17. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation . *Nature.* 1994;371:435-438.
18. Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tissues: A comprehensive review for oral healthcare providers. *J. Contemp Dent Pract.* 2005; 6:1-16.
19. Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T, Fuks F. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene.* 2007;26:1650-1655.
20. Burnett T, Sleeman J. Uneven distribution of methylation sites within human papillomavirus 1a genome: possible relevance of viral gene expression. 1984;12:8847-8860.

21. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer*. 2004;108:741-749.
22. Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:5799-5803.
23. Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet*. 2001;38:285-303
24. Crawford LV, Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology*. 1963; 21:258-263.
25. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer res*. 2002;62:6442-6446.
26. Culp TD, Budgeon LR, Marinkovich MP, Meneguzzi G, Christensen ND. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *J Virol*. 2006;80:8940-8950.
27. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analyzed by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76:2589-2593.
28. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Molecular cloning, refined physical map and heterogeneity of methylation sites of papilloma virus type 1a DNA. *Eur J Biochem*. 1980;109:457-461.
29. Day PM, Roden RB, lowy DR, Schiller JT. The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral/transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains. *J Vir*. 1998:142-150.
30. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur hausen H. Classification of papillomavirus. *Virology*. 2004;324:17-27.
31. Desaintes C, Demeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F. Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. *EMBO J*. 1997; 16:504-514.
32. Doerfler W, Böhm P. Current topics in microbiology and immunology. DNA methylation: Basic mechanisms. Springer . Germany. 2006.
33. Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubbert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev. Biol*. 2001;106:89-97.
34. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32S:S7-S15.
35. Duensing S, Münger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: Insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*. 2004; 109:157-162.
36. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80:3812-3815.
37. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997; 71:2449-2456.
38. Feinberg AP and Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:143-153.
39. Feng Q, Balasubramanian A, Hawes S, Toure P, Sow P, Dem A. Detection of hypermethylated genes in women with and without cervical neoplasia. 2005;97:273-282.
40. Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, Lopez-Albaitero A, Gollin SM. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): a natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2005; 41:807-815.
41. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology, Molecular biology, pathogenesis and control. 2000; Cap 4,5:100-128.
42. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1827-31
43. Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:490-95
44. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988; 62:4321-4330.

45. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Nat Can Inst.* 2000;92:709-720.
46. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 1999;11:191-199.
47. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol* 2001;13:183-188.
48. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol.* 2004; 31:744-54.
49. Gissmann L, Pfister H, zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV) characterization of four different isolates. *Virology* 1977; 76:569-580.
50. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K, Klock G. The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987; 6: 3735-3743.
51. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2004; 124:520-526.
52. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer.* 2003; 107:394-400.
53. Hall J, Hashibe M, Boffetta P, Gaborieau V, Moullan N, Chabrier A. The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancers of the upper aerodigestive tract. *Carcinogenesis* 2007; 28:665-671.
54. Harrington MA., Jones PA, Imagawa M and Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85:2066-2070.
55. Haverkos HW. Multifactorial etiology of cervical cancer: a hypothesis. *Med Gen Med.* 2005;7:57
56. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 1989; 8:3905-3910.
57. Heard E, Clerc P, Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet.* 1997; 31:571-610.
58. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1998; 18:6538-6547
59. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P. Human Papillomavirus and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1772-1783.
60. Howell RE, Gallant L. Human papillomavirus type 16 in an oral squamous carcinoma and its metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral pathol.* 1992; 74:620-626.
61. <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/website/Lects/VIRAL.HTM>.
62. IARC. Alcohol Drinking. Monographs of the evaluation of carcinogenic risk of to humans. Lyon. IARC. 1988;44:299.
63. IARC. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1995. Volume 64: Human Papillomaviruses. IARC, Lyon.
64. IARC. Tobacco smoking. Monographs of the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to human. Lyon. IARC. 1986;38: 273-274.
65. Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a mexican population. *Oral surg Oral med Oral pathol Oral radiol Endod.* 2005; 99:311-315.
66. Ishida T, Hamano A, Koiwa T, Watanabe T. 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology.* 2006;3:69.

67. Ishiji T. Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol.* 2000; 27:73-86.
68. Jiménez LF y Merchant H. *Biología celular y molecular.* Pearson Education, México, Parte IV, 2003. Cap. 21.
69. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002; 3:415-428.
70. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science.* 2001; 293:1068-1070.
71. Jones PA, Vogt PK. *DNA methylation and cancer.* Springer. 2000
72. Kalantari M, Bernard HU. Gene expression of papillomaviruses. *Papillomavirus research: From natural history to vaccines and beyond.* 2006; Chapter 4:41-52.
73. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. 2004; 78:12762 -12772.
74. Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV-16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol pathol.* 1998; 17:146-153.
75. Kautiainen TL, Jones PA. DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem.* 1986;261:1594-1598.
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. *J Virol* 2003; 77:12450-12459.
77. Klusmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol.* 2003; 162:747-753.
78. Koch WM, McQuone S. Clinical and molecular aspects to squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker. *Curr opin Oncol.* 1997; 9:257-261.
79. Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S. 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol.* 2002; 76:9389-97
80. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell.* 1995; 8:197-205.
81. Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet.* 1996;30:441-464.
82. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins binds p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* 1992; 11:3045-3052.
83. Li HP, Leu YW, Chang YS. Epigenetics changes in virus-associated human cancers. *Cell Res.* 2005; 15:262-271
84. List H, Patzel V, Zeidlers U, Schopen A, and Rühl G. Methylation sensitivity of the enhancer from the human papillomavirus type 16. 1994; 269:11902 -11911.
85. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004; 18:2315-2335.
86. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J. Alcohol, tobacco, diet and de risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-controls studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995; 31B:181-187.
87. Mantovani F, Banks L, The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene.* 2001; 20:7874-7887.
88. Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer.* 2007; 43:415-432.
89. Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L, Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer.* 1993; 72:1369-1375.

90. McBride A, Myers G, (1997). The E2 protein human papillomavirus. Los Alamos National Laboratory p. III-54 – III-72.
91. McCabe MT, Low JA, Imperiale MJ, Day ML. Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway. *Oncogene* 2006;25:2727-2735.
92. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 2002; 102:152-8.
93. Miller CS, Johnstone BM, Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral surg Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:622-635.
94. Minarovits J. Epigenotypes of latent herpesvirus genomes. *Curr Top Microbiol Inmunol*. 2006; 310:61-80.
95. Mohar A, Frias-Mendivil M, SÚchil-Bernal L, Mora-Macias T, de la Garza JG. Epidemiología descriptiva en el Instituto Nacional de Cancerología de Mexico. 1997; 39:253-258.
96. Mork J, Lie AK, Glatre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344:1125-31.
97. Munger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M. Biological activates and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20:7888-7898.
98. Műnger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989; 63: 4417-4421.
99. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998; 393:386-389.
100. Nishigaki M, Aoyagi K, Danjoh I, Fukaya M, Fukaya, Yanagihara K. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypometilathylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*. 2005; 65: 2115-2124.
101. O'Connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NF-1 at a conserved composite regulatory element. *Virology*. 1995; 207:77-88.
102. O'Connor M, Tan S, Tan C, Bernard HU. YY1 represses human papillomavirus type 16 transcription by quenching AP-1 activity. *J virol*. 1996; 70:6529-6539.
103. O'Connor MJ, Stunkel W, Koh CH, Zimmermann H, Bernard HU. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses. *J Virol*. 2000;74:401-410.
104. Okuwaki M, Verreault A. Maintenance DNA methylation of nucleosome core particles. *J. Biol. Chem*. 2004; 279:2904-2912.
105. Oshimo Y, Nakayama H, Ito R, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K. Promoter methylation of cyclin D2 gene in gastric carcinoma. *Int J Oncol*. 2003; 23:1663-1670.
106. Pinholt EM, Rindum J, Pindborg JJ. Oral cancer: a retrospective study of 100 danish cases. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 35:77-80
107. Ragin CC, Reshmi SC, Gollin SM. Mapping and analysis of HPV16 integration sites in a head and neck cancer cell line. *Int J Cancer*. 2004; 110:701-709.
108. Reichart PA, Phillipsen HP. Oral erythroplakia-a review. *J Oral Oncology*. 2005;41;551-561.
109. Rösl F, Arab A, Klevenz B, zur Hausen H. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomavirus. *J Gen Virol*. 1993; 74:791-801.
110. Rösl F, Waldeck W, Sauer G. isolation of episomal bovine papillomavirus chromatin and identification of a DNase I-hypersensitive region. *J Virol*. 1983; 46:567-574.
111. Schneider A and Koutsky L. Epidemiology of cervical cancer and of HPV infection. In epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. IARC, Lyon, France. 1992; 119:3-53.

112. Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol.* 2003; 77:13125-13135.
113. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. DNA methylation in health, disease and cancer. *Curr Mol Med.* 2007; 7:85-102.
114. Shen CK, Maniatis T. Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit beta-like globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77:6634-6638
115. Sibbet G, Romero-Graillet C, Meneguzzi G, Campo MS. Alpha6 integrin is not the obligatory cell receptor for bovine papillomavirus type 4. *J Gen Virol.* 2000; 81:327-334.
116. Sisk EA, Bradford CR, Jacob A, Yian CH, Tang G, Harris MO. Human papillomavirus infection in “young” versus “old” patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2000; 22:649-657.
117. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004; 108:766-772.
118. Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ. Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer.* 1992; 51:845-50.
119. Stein S Gary, Pardee B Arthur. Cell cycle growth control: Regulation and cancer. Chapter 17. P 571-598. 2004.
120. Strauss MJ, Shaw EW. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1949; 72:46-50.
121. Stünkel W, Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J Virol.* 1999; 73:1918-1930.
122. Stunkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor M and Bernard HU. Nuclear matrix attachment region of human papillomavirus-16 repress or activated the E6 promotor depending on the physical state of the viral DNA. *J. Virol.* 2000; 74:2489-2501.
123. Sutter D and Doerfler W. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells are inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA .* 1980; 77:253-256.
124. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983; 12:418-424.
125. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57:449-455.
126. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005; 32S:S59-S66.
127. Tan SH, Gloss B, Bernard HU. During negative of the human papillomaviru-16 E6 promotor, the viral E2 protein displaces Sp1 from a proximal promoter element. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:251-256.
128. Tan SH, Leong LE, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperatively to two flanking sites and represses the E6 promotor through displacement of Sp1 and TFIID. *J Virol.* 2000; 68:6411-6420.
129. Tate PH, Bird AP. Effects in DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 1993; 3:226-231.
130. Thain A, Jenkins O, Clarke AR, Gaston K. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J Virol* 1996; 70:7233-7235.
131. Turan T, Kalantari M, Calleja-Macias I, Cubie H, Cuschieri K, Villa L. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: a biomarker of neoplastic progression?. *Virology.* 2006; 349:175-183.
132. Turan T, Kalantari M, Cuschieri K, Cubie H.A, Skomedal H, Bernard HU. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gen methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. *Virology.* 2007; 361:185-193.

133. Tyler JK, Kadonaga JT. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell*. 1999; 99:443-446.
134. van der Ploeg LH, Flavell RA. DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell*. 1980;19:947-958.
135. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2001; 93:232-235.
136. Van Tine BA, Kappes JC, Banerjee NS, Knops J, Lai L, Steenbergen RD. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. *J Virol* 2004;78:11172-86.
137. Van tine BA, Knops J, Broker TR, Chow LT, Moen PT Jr. In situ analysis of the transcriptional activity of integrated viral DNA using tyramide FISH. *Dev Biol*. 2001; 106:381-385.
138. Velazquez TA, Gariglio Vidal P. Posible papel del factor de transcripción AP-1, en la regulación tejido-específica del papilomavirus humano. *Rev Invest Clin*. 2002; 54:231-242.
139. Verma M. Viral genes and methylation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 983:170-180.
140. Volpers C, Unckell F, Schirmacher P, Streeck RE, Sapp M. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol*. 1995; 69:3258-3264.
141. Wettstein F, Stevens J. Shope papilloma virus DNA is extensively methylated in non-virus producing neoplasms. *Virology*. 1983; 126:493-504.
142. Wey PD, Lotz MJ, Triedman LJ. Oral cancer in women nonusers of tobacco and alcohol. *Cancer*. 1987; 60:1644-1650.
143. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 1998; 152:145-156.
144. Wiley DJ, Huh J, Rao JY, Chang C, Goetz M, Poulter M. Methylation of human papillomavirus genomes in cells of anal epithelia of HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;39:143-151.
145. Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1775:138-162.
146. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 protein: form, function, and features. *Virus Genes*. 2002; 24:275-290.
147. www.dep.iarc.fr. Sitio Web de la IARC, contiene los registros de GLOBOCAN. 2002
148. www.tulane.edu/~dmsander/www/335/papovaviruses.html
149. Zakrzewska J. Fortnightly review: Oral cancer. *BMJ*. 1999; 318:1051-1054.
150. Zhang J, Martins C, Fansler Z, Roemer K, Kincaid E, Gustafson K. DNA methylation in anal intraepithelial lesions and anal squamous cell carcinoma. 2005; 11:6544-6549.
151. Zhang Y, Ng HH, Erdjument Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*. 1999; 13:1924-1935.
152. Zhao W, Noya F, Chen WY, Townes TM, Chow LT, Broker TR. Trichostatin A up-regulates human papillomavirus type 11 upstream regulatory region-E6 promoter activity in undifferentiated primary human keratinocytes. *J Virol*. 1999; 73:5026-5033.
153. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*. 2006; 11:2286-2302.
154. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W and Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*. 1974; 13:650-656.
155. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1977; 78:1-30.