



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“CDH1 Y SNAI1 SON REGULADOS POR E7 DE VIRUS DE
PAPILOMA HUMANO TIPO 16 Y 18”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. PEDRO ROSENDO CHALMA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Ciudad de México, marzo del 2022.



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, con sede en el Instituto Nacional de Cancerología-SSA en la Ciudad de México.

Bajo la dirección del:

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá

Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM

Coodirección de la:

Dra. Amparo Cano García

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"- CSIC-UAM

Y la asesoría de:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Facultad de Medicina - UNAM

Dr. Alfonso Dueñas González

Instituto de Investigaciones Biomédicas - UNAM

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 253804 y Fundación Miguel Alemán en el Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección del Dr. Alejandro M. García Carrancá, y con financiamiento del Ministerio de Economía y Empresa (MINECO; SAF2013-44739-R) de España bajo la dirección de la Dra. Amparo Cano García.

Durante el periodo en el que el C. Pedro Rosendo Chalma fue estudiante de Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, recibió la beca con número de CVU/becario: 210614/203376 del CONACyT.

- AGRADECIMIENTOS -

Se agradece a la **Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP)** por otorgar la Beca del Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes, para realizar una estancia de investigación del Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "*Alberto Sols*" de la Universidad Autónoma de Madrid, España, durante el periodo del 30 de octubre de 2013 al 28 de febrero de 2014.

A la **Dra. Amparo Cano García**, por su grato recibimiento durante mi estancia doctoral y por brindarme todo el apoyo y asesoría para concluir este proyecto.

Un agradecimiento muy especial al **Dr. Francisco Portillo Pérez** por todas sus atenciones durante mi estancia en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "*Alberto Sols*" - UAM.

A mi tutor, **Dr. Alejandro M. García Carrancá**, por brindarme toda su confianza para desarrollar este proyecto en el que aprendí, maduré y me formé como investigador. Sin duda alguna, me llevo un grato recuerdo de mi formación doctoral.

A la M. en C. **Miriam C. Guido Jiménez** y la Dra. **Rocío S. Méndez Martínez** por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

A **Verónica Antonio Véjar**, **Gabriele Davide Bigoni Ordóñez** y **Carlos César Patiño Morales** por brindarme su amistad y apoyo en los experimentos desarrollados en este proyecto.

Un agradecimiento muy especial a **Raquel López Paniagua**, por todas sus atenciones y apoyo técnico, por brindarme su amistad y alentarme en ser perseverante.

- DEDICATORIAS -

A mis amados abuelos:

Don **Zacarías Chalma García**[†] y Doña **Virginia García Martínez**[†]

y

Don **Manuel Rosendo García**[†] y Doña **Ana Hidalgo Ramírez**[†]

Que me inculcaron los buenos hábitos y me incitaron a ser perseverante, y aunque hoy día ya no están físicamente conmigo, me bendijeron con unos padres maravillosos, Don **Pedro Eusebio Rosendo Hidalgo** y Doña **Rufina Chalma García**, a ustedes les dedico todo este esfuerzo y agradezco de corazón por darme la mejor herencia que pude tener, la educación, que sé, les costó muchos días de trabajo y desvelo cuando éramos pequeños, puesto que no solo abandonaron sus labores en el campo, sino que se despidieron de sus poblados con la finalidad de migrar a un lugar mejor, en donde mis hermanos y yo pudimos obtener mejores oportunidades para emprender y vivir nuestros propios sueños. Gracias padres míos por enseñarnos a ser autosuficientes, por enseñarnos el valor del trabajo, de la honradez y de la perseverancia.

A mis hermanos, **Arturo, Anaid y Santiago**, que en cuyos momentos difíciles, Dios nos ha bendecido para estar siempre unidos y nos ha dado fuerzas y la sabiduría para sobresalir en todo. Especialmente a ti **Santiago**, nuestro querido hermano, que nos diste una lección de vida, de fortaleza y temple para poder vencer el cáncer. *“Si puedes creer, al que cree todo le es posible (Marcos 9:23)”*.

A **Luis Humberto Moreno Hernández**, por tu paciencia y apoyo durante mi travesía con este proyecto que por fin ha culminado.

¡Los amo mucho familia!

A **Claudia García Morales, Paola Guzmán Guzmán, Ana Lilia Ramírez, José Eduardo P. Blasnich, Daniel Meza de la Rosa, Gregorio Carballo y E. Alejandro G. Ortiz**, que me han brindado su amistad y con los que he compartido grandes momentos y sueños, muchas gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, **Selik A. Camacho**[†], **Martha Martínez Salazar, F. Germán Villanueva, Salvador Vázquez, Verónica M. Báez, Heriberto A. Valencia G, Graciela Ruíz, Karen de la Cruz y Yaquelin Díaz**, que compartimos y vivimos gratas experiencias en este camino de la investigación y de la ciencia.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
I. RESUMEN.....	ii
II. ABSTRACT	iii
III. INTRODUCCIÓN	1
III.1 <i>Datos generales</i>	1
III.2 <i>Características distintivas (hallmarks) moleculares del cáncer de cérvix uterino</i>	1
III.3 <i>Efecto transformante e inmortalización celular mediada por E6 y E7 de VPH</i>	3
III.4 <i>Características generales de E7 de VPH</i>	5
III.5 <i>E7 de VPH-AR interacciona con DNMT1 y HDAC1</i>	6
III.6 <i>E7 de VPH regula la expresión de genes celulares por mecanismos epigenéticos</i>	6
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
V. HIPÓTESIS	9
VI. OBJETIVO GENERAL	10
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	11
VIII. 1 <i>Líneas celulares</i>	11
VIII. 2 <i>Tratamientos con 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC) y tricostatina A (TSA)</i>	12
VIII. 3 <i>Transfección de RNA pequeño de interferencia sintético (siRNA)</i>	12
VIII. 4 <i>Modificación con bisulfito de sodio y análisis de metilación del DNA</i>	13
VIII. 5 <i>Extracción de RNA, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)</i>	14
VIII. 6 <i>Extracción de proteínas y análisis de Western blot</i>	16
VIII. 7 <i>Análisis estadístico</i>	17
IX. RESULTADOS.....	18
IX. 1 <i>Diferentes patrones de metilación en la región promotora de CDH1 están presentes en las líneas celulares de cáncer positivas a VPH tipo 16 y 18</i>	18
IX. 2 <i>Los niveles de metilación en la región promotora de CDH1 se asocian con los niveles de expresión de mRNA y proteína de CDH1</i>	18
IX. 3 <i>El nivel de expresión de CDH1 está asociado con el nivel de expresión de SNAI1</i>	20
IX. 4 <i>Los tratamientos con 5-Aza-dC y TSA ejercen un efecto sobre el patrón de metilación y sobre la reexpresión de CDH1</i>	21

<i>IX. 5 La supresión de E7 por siRNA modifica los patrones de metilación del promotor de CDH1 e induce la expresión de CDH1 en líneas celulares HeLa y SiHa</i>	25
<i>IX. 6 La supresión de E7 por siRNA disminuye la expresión de SNAI1 y SNAI2 en las líneas celulares HeLa y en SiHa</i>	25
X. DISCUSIÓN	29
XI. CONCLUSIÓN	33
XII. FUTUROS ALCANCES	33
XIII. REFERENCIAS	34
XIV. ANEXO I - Artículo Científico: Rosendo-Chalma P, et al. International Journal of Oncology. 2020.	43
XV. ANEXO II - Solicitud de patente mexicana No. MX/a/2019/014593	56
XVI. ANEXO III - Coautor en artículo científico publicado en Oral Diseases.	109
XVII. ANEXO IV - Coautor en artículo científico publicado en BMC Cancer.	114

LISTA DE ABREVIATURAS

5-AzadC	5-aza-2'-desoxicitidina
BSP	PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio
CaCu	Cáncer de cérvix uterino
CC	Cáncer cervical
CDH1	Cadherina 1, antes llamado E-cadherina
cDNA	DNA complementario
CR	Regiones conservadas
DNMT	DNA metiltransferasa
HAT	Acetiltransferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
MSP	PCR específica de metilación
NURD	Desacetilación de histonas
pRb	Proteína del retinoblastoma
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
siRNA	Small interfering RNA, en español RNA pequeño de interferencia
SNAI1	Represor 1 transcripcional de la familia snail, antes SNAIL1
SNAI2	Represor 2 transcripcional de la familia snail, antes SLUG o SNAIL2
TEM	Transición epitelio-mesenquima
TSA	Tricostatina A
VPH	Virus de Papiloma Humano
VPHs-AR	Virus de Papiloma Humano de alto riesgo o Papilomavirus Humano de alto riesgo

I. RESUMEN

Antecedentes

Una característica común de los cánceres asociados con virus es la expresión disminuida del gen *CDH1*, que codifica para E-cadherina, en general mediante la activación de DNA metiltransferasas (Dnmts). Se ha demostrado que la proteína E7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo (VPHs-AR) interactúa con Dnmt1 y la desacetilasa de histona tipo 1 (HDAC1), activando la actividad DNA metiltransferasa y desacetilasa de histonas que dan lugar a la regulación de la expresión de genes virales y celulares durante el proceso carcinogénico.

Objetivo

Determinar si E7 puede regular negativamente la expresión de *CDH1* por mecanismos epigenéticos o por inducción de reguladores negativos de la expresión de *CDH1*, incluidos los represores transcripcionales Snai1 y Snai2 de la familia Snail.

Materiales y métodos

Las líneas celulares HeLa y SiHa se trataron con 5-AzaC, TSA o se transfectaron con siRNAs contra E7 de VPH 16 o 18 y GAPDH respectivamente. Se determinó el patrón de metilación del promotor *CDH1* mediante PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito (BSP). Se determinó también el nivel de expresión de *CDH1* y su asociación con los niveles de expresión de *SNAI1* y *SNAI2*, los cuales son reguladores negativos de *CDH1*; el nivel de expresión se determinó mediante qPCR a nivel de mRNA y mediante Western blot a nivel de proteína.

Resultados

Se identificaron diferentes frecuencias de metilación en el promotor de *CDH1* entre células HeLa (88.24%), SiHa (17.65%) y Ca Ski (0%). Se observaron diferencias significativas en la expresión de *SNAI1* entre estas líneas celulares y se identificó una asociación inversa entre los niveles de expresión de *SNAI1* y *CDH1*. La supresión de *E7* no solo aumentó la expresión de *CDH1*, sino que también disminuyó notablemente la expresión de *SNAI1* y modificó el patrón de metilación del promotor de *CDH1*. Estos resultados sugirieron que la expresión de *CDH1* fue dependiente de la expresión de *SNAI1* y fue inversamente asociado con la expresión de *E7*.

Conclusión

Nuestros resultados sugieren que E7 de VPH16/18 reguló negativamente la expresión de *CDH1* por medio de las siguientes vías en las que Snai1 está involucrado: la primera fue por hipermetilación de la región promotora de *CDH1* y aumento en la expresión de *SNAI1*, como se observa en la línea celular HeLa; y la segunda fue por hipometilación de la región promotora de *CDH1* y aumento en la expresión de *SNAI1*, tal como se observa en la línea celular SiHa. Por lo tanto, la supresión de *CDH1* y la expresión de *SNAI1* pueden considerarse como biomarcadores de metástasis en el cáncer de cuello uterino.

Palabras clave

Epigenética, Virus del Papiloma Humano, E7, SNAI1 (SNAIL/SNAIL1), SNAI2 (SLUG/SNAIL2), CDH1, E-cadherina.

II. ABSTRACT

Background

A common characteristic of cancers associated with viruses is decreased expression of the *CDH1* gene, which encodes E-cadherin, in general by activation of DNA methyltransferases (Dnmts). The E7 protein from high risk human papillomaviruses (HR-VPHs) has been demonstrated to interact with Dnmt1 and histone deacetylase type 1 (HDAC1), activating DNA methyltransferase and histone deacetylase activity that lead to the regulation of expression of viral and cellular genes during the carcinogenic process.

Objective

Determine if E7 can negatively regulate the expression of *CDH1* by epigenetic mechanisms or by induction of negative regulators of *CDH1* expression, including Snail family transcriptional repressor Snai1 and Snai2.

Materials and methods

HeLa and SiHa cell lines were treated with 5-AzadC, TSA or were transfected with siRNAs against *VPH18 E7*, *VPH16 E7* and *GAPDH* respectively. The methylation pattern of the *CDH1* promoter was determined by Bisulfite Sequencing PCR (BSP). The expression level of *CDH1* and its association with the expression levels of *SNAI1* and *SNAI2*, which are negative regulators of *CDH1*, were also determined; the level of expression was determined by qPCR at the mRNA level and by Western blot at the protein level.

Results

Different methylation frequencies were identified in the *CDH1* promoter between HeLa (88.24%), SiHa (17.65%) and Ca Ski (0%) cells. Significant differences in expression of *SNAI1* were observed between these cell lines, and an inverse association was identified between the expression levels of *SNAI1* and *CDH1*. In addition, suppressing E7 not only increased the expression of *CDH1*, but notably decreased the expression of *SNAI1* and modified the methylation pattern of the *CDH1* promoter. These results suggested that the expression of *CDH1* was dependent on the expression of *SNAI1* and was inversely associated with the expression of *E7*.

Conclusion

E7 from VPH16/18 negatively regulated the expression of *CDH1* by the two following pathways in which Snai1 is involved: the first was by hypermethylation of the *CDH1* promoter region and increasing expression of *SNAI1*, as observed in HeLa; and the second was by hypomethylation of the *CDH1* promoter region and increasing expression of *SNAI1*, as observed in SiHa. Therefore, the suppression of *CDH1* and expression of *SNAI1* may be considered to be biomarkers of metastasis in uterine cervix cancer.

Keywords

Epigenetic, Human Papillomavirus, E7, SNAI1 (SNAIL/SNAIL1), SNAI2 (SLUG/SNAIL2), CDH1, E-cadherin.

III. INTRODUCCIÓN

III.1 Datos generales

Según los datos publicados y las estimaciones actuales, cerca del 20% de todos los casos de cáncer que afectan a hombres y mujeres son atribuidos a agentes biológicos infecciosos, incluidos *Helicobacter pylori* y virus del papiloma humano (VPH), seguidos del virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de Epstein-Barr (VEB) [1-3]. En el caso del VPH, específicamente los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, comúnmente referidos como de alto riesgo (AR), no solo están asociados con el cáncer cervical (CC), reportado como el tercer tipo de cáncer más prevalente en mujeres a nivel mundial en el 2017, sino que también están asociados con otros tipos de cánceres, como el anal, el de pene, de vulva, de vagina y de cabeza y el cuello [1, 4].

Las infecciones persistentes con virus de papiloma humano de alto riesgo (VPHs-AR) son necesarias, pero no suficientes para causar cáncer, lo que indica la existencia de múltiples etapas en la carcinogénesis del cuello uterino que contribuyen a las características distintivas que subyacen en el fenotipo de los tumores [3, 5]. Por esta razón, ha sido de gran interés estudiar los mecanismos por los cuales las infecciones persistentes con VPHs-AR contribuyen al desarrollo del cáncer. Por otro lado, se ha demostrado que el VPH induce una serie de mecanismos que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune y a la muerte celular activada por apoptosis, que finalmente dan lugar a la transformación, proliferación e inmortalización de la célula huésped [6, 7].

III.2 Características distintivas (hallmarks) moleculares del cáncer de cérvix uterino

Los factores o características distintivas (hallmarks) que principalmente se han reportado durante el proceso carcinogénico del cáncer de cérvix uterino (CaCu) asociado a VPH son: (i) infección por VPHs-AR [8-11]; (ii) la carga viral [12-15]; (iii) que la infección inicial se desarrolle en células basales o parabasales localizadas en la zona de transformación del cérvix uterino, en donde se encuentra una mayor población de células troncales con capacidad de dividirse y de renovarse, y que además, expresan los recetores tales como proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs), laminina-332, integrina $\alpha 6$ y receptores de factor crecimiento (GFR) epidermal o queratinocítico, necesarios para la unión e internalización del virus en su célula blanco [16-21]; (iv) mutaciones oncogénicas en los genes *PIK3CA*, *KRAS* y *EGFR* [22]; (v) interrupción del ciclo de vida del VPH por el fenómeno de integración del genoma viral al genoma celular [12, 23-25]; (vi) activación de la

maquinaria de metilación celular, en donde si bien se conoce que la metilación del DNA puede activarse como un mecanismo de defensa celular ante DNA foráneo, se ha reportado que el VPH utiliza a la maquinaria de metilación para: (a) regular la expresión de sus genes en su ciclo de vida durante la diferenciación celular, y (b) mantener regiones transcripcionalmente activas en sitios en donde el genoma del VPH se ha integrado en tándems, para así mantener regulada la transcripción de sus genes [26-31]; (vii) pérdida de función de la proteína E2 del VPH, esto puede darse por dos vías, la primera se debe a que la integración del genoma viral es más frecuente en la región que comprende las regiones genéticas E2/E4 del VPH, lo que da como resultado a la nula expresión de E2 [32, 33], y la segunda vía es por la metilación de los sitios CpG localizados en el sitio de unión de E2 proximal a P97 (E2BS-1) de la región larga de control (LCR) del VPH, dando lugar a la pérdida de la función represora de E2 [34, 35]; y por último (viii) la expresión desregulada de los oncogenes E6 y E7 ganada por la pérdida de función de E2 en regiones transcripcionalmente activas de los genomas de VPH, lo que trae como consecuencia un aumento de función de las oncoproteínas E6 y E7 necesarias para la transformación oncogénica (Fig. 1) [36, 37].

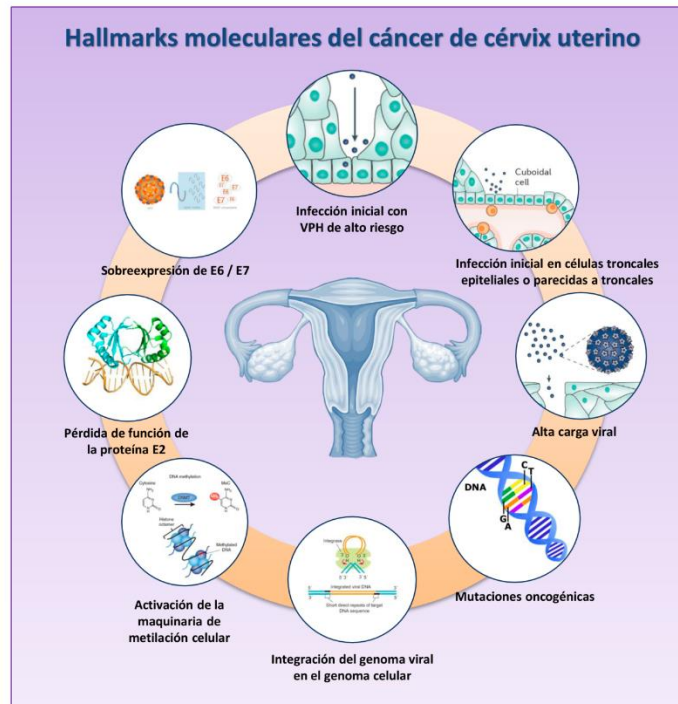


Figura 1. Características distintivas (hallmarks) moleculares del cáncer de cérvix uterino. (i) Infección por VPH-AR, (ii) infección inicial en las células de la zona de transformación, específicamente células troncales, (iii) alta carga viral, (iv) mutaciones oncogénicas, (v) interrupción del ciclo de vida del VPH por el fenómeno de integración del genoma viral al genoma celular, (vi) activación de la maquinaria de metilación celular, (vii) pérdida de función de la proteína E2 del VPH, y (viii) expresión desregulada de los oncogenes E6 y E7 ganada por la pérdida de función de E2 en regiones transcripcionalmente activas de los genomas de VPH.

III.3 Efecto transformante e inmortalización celular mediada por E6 y E7 de VPH

La oncoproteína E6 de VPH permite la evasión de la muerte celular por apoptosis a través de dos vías, la primera es por la degradación proteosomal de p53 a través de su asociación con la ubiquitina ligasa UBE3a (E6AP) [38-40] (Fig. 2), y la segunda es a través de la interacción de E6 con hADA3, la cual es una proteína que funciona como coactivador de la transactivación mediada por p53, en donde E6 induce la degradación de hADA3, impidiendo de esta forma la estabilización de la proteína p53, evitando así que las células infectadas entren en senescencia a través de la supresión de la vía p14/ARF [41, 42].

Por otro lado, la oncoproteína E7 del VPH desempeña dos funciones principales para inducir el proceso transformante y proliferativo de la célula, la primer función de E7 es unirse con los miembros de la familia de la proteína del retinoblastoma (pRb), tales como p107 y p130, a través del motivo LXCXE localizado en la porción CR2 de E7 [43] (Fig. 3), dando

lugar a la actividad transcripcional de los factores de transcripción E2F, regulando así la entrada y la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular [44]; la segunda función de E7 es desestabilizar a pRb a través de su degradación por la vía de ubiquitin-proteosoma, dando lugar a la transformación oncogénica [45].

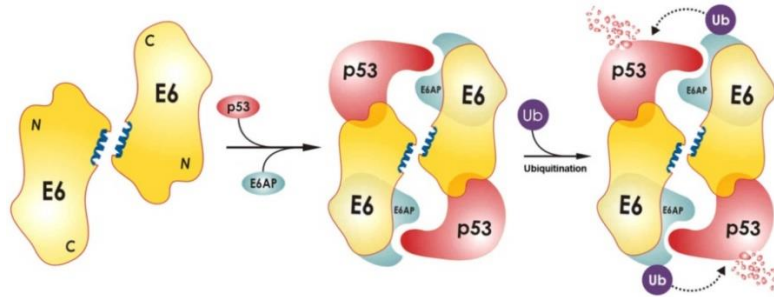


Figura 2. - Modelo de dimerización de la oncoproteína E6 de VPH y su efecto sobre p53. En los tipos de VPH de alto riesgo, la degradación de p53 ocurre por el modelo de dimerización de E6 a través de su dominio N-terminal y particularmente las hélices $\alpha 2$ (mostradas en azul). Cada molécula E6 del dímero se une a una molécula de ubiquitina ligasa E6AP y a una molécula de p53 para promover la poliubiquitinación de p53 por el complejo E6/E6AP. La poliubiquitinación de p53 conduce a su degradación, a la desregulación del ciclo celular y a la posterior proliferación celular anormal [46].

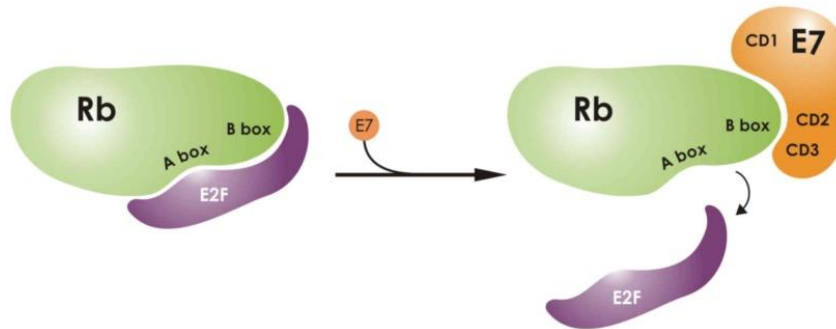


Figura 3. - Interacción de la oncoproteína E7 con Rb y liberación de E2F. Inicialmente, E2F se une a Rb a través de los compartimientos A y B (box A y B). La proteína E7 contiene tres regiones conservadas CD1, CD2 y CD3 (mejor conocidos como CR1, CR2 y CR3) que contienen los motivos Cys-X-X-Cys. Después de la interacción de E7 con Rb, CD2 se une al compartimiento B (box B) de Rb a través de su motivo LXCXE. La flexibilidad de E7 permite la unión de la región CD3 al compartimiento B (box B) de Rb. A través de estas interacciones, el complejo Rb-E2F se interrumpe, lo que conduce a una progresión celular temprana y anormal hacia la fase S del ciclo celular [46].

III.4 Características generales de E7 de VPH

La oncoproteína E7 de VPH16 ha sido la proteína viral más estudiada, está constituida por un total de 98 aminoácidos y se ha reportado que posee una vida media de aproximadamente 55 min en células Ca Ski y de 70 min en células SiHa, sugiriendo que, dicha vida media puede ser indicativa de la función regulatoria de E7 [47]. La proteína E7 tiene tres regiones conservadas, CR1, CR2 y CR3, también conocidas como CD1, CD2 y CD3, en donde las regiones CR1 y CR2 tienen una alta similitud a las regiones conservadas (CR) de la proteína E1A del Adenovirus [48, 49], y la región CR3 en forma de dedos de zinc también es similar a otras oncoproteínas virales [48] (Fig. 4A). Estas similitudes estructurales se reflejan en similitudes funcionales en la transformación y transactivación entre las oncoproteínas virales [48, 50].

La CR1 de E7 está constituida por los residuos 1-15 del extremo amino, en donde ciertas secuencias de CR1 son necesarias para la degradación de pRb [51], por ejemplo, entre varios factores que se unen a la región CR1 se encuentra el complejo ubiquitin quinasa Cullin-2, que se cree es importante para la degradación de pRb [52] (Fig. 4B). Por otro lado, CR2 está formada por los residuos 16-38, contiene el motivo LXCXE, que establece interacciones de alta afinidad con la proteína pRb [53] y contiene el sitio primario de fosforilación, el cual es un par de serinas localizadas en las posiciones 31 y 32 (denominadas como S31 y S32), las cuales son fosforiladas por la *caseína quinasa II (CKII)* [54, 55], en donde dicha fosforilación incrementa la afinidad de unión de E7 a factores de transcripción generales (GTFs) tales como TBP, p300 y p53 [56]; por otro lado, el parche de aminoácidos ácidos (denominado como parche ácido) localizado río abajo del sitio de fosforilación contribuye con la unión a pRb a través de interacciones iónicas con aminoácidos básicos en pRb [57], la fosforilación de S31 y S32 incrementa el tamaño del parche ácido, sugiriendo que estos residuos pueden funcionar como una unidad [58] (Fig. 4B). Por último, CR3 consta de los residuos 39-98 del terminal carboxilo, en donde esta región contiene dos motivos CXXC, que forman una estructura de dedos de zinc y permiten la dimerización de E7 [48, 53, 59], lo que le permite a E7 interactuar con factores de transcripción, regulando la expresión de genes asociados al ciclo celular [60-63], a la diferenciación celular [61, 63, 64], a la respuesta inmune innata [60, 65, 66], a genes de respuesta al estrés y daño del DNA [60] y factores de crecimiento [63]; y por otro lado, E7 puede interactuar molecularmente con diferentes proteínas celulares, que trae como resultado la activación o inhibición de varios procesos transcripciones [61, 62], por ejemplo, E7 puede asociarse con y alterar

enzimas que regulan la estructura de la cromatina, tales como Mi2 β [67], acetiltransferasas de histonas (HATs) [68-70], desacetilasas de histonas (HDACs) [67, 71] y DNA metiltransferasas (DNMTs) [72] (Fig. 4B).

III.5 E7 de VPH-AR interacciona con DNMT1 y HDAC1

Se ha reportado que la oncoproteína E7 de VPH-AR desempeña un papel crucial en la transformación oncogénica no solo por su capacidad para formar complejos con miembros de la familia de pRb y desestabilizarlos [37, 45], sino por su capacidad de interactuar con otras proteínas, tales como la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) [67, 71] y la DNA metiltransferasa 1 (Dnmt1) [72].

En este sentido, se conoce que E7 se une a HDAC1 vía su motivo de dedos de zinc a través de una proteína intermedia denominada Mi2 β [67], en donde Mi2 β es un componente del complejo de remodelación de nucleosomas y de desacetilación de histonas (NURD) que tiene la capacidad de modificar la estructura de la cromatina a través de la desacetilación de histonas y el reposicionamiento de nucleosomas dependiente de ATP [71, 73]. La formación de este complejo es necesario para el mantenimiento de los episomas virales, para controlar la proliferación celular y extender la vida celular [67, 71]. Aunado a esto, un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina en células de Ca Ski demostró que E7 y HDAC están físicamente asociados con el promotor de *clase I* del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y la desacetilación de histonas [74], así como la represión de la cromatina y la regulación negativa de los genes de *clase I* del MHC y la cadena pesada de MHC de clase I, y la represión de los genes que codifican el transportador asociado con la subunidad de procesamiento del antígeno 1 (TAP1) y la proteína 2 de bajo peso molecular (LMP2) [75].

Por otro lado, la asociación de E7 con Dnmt1 está dirigida y mediada por el dominio de dedos de cinc CR3 en E7, que se conoce contribuye a la funciones de transformación de E7 y estimula la actividad de metiltransferasa de Dnmt1, lo que puede conducir a una metilación aberrante del genoma y la transformación celular como consecuencia del silenciamiento de genes supresores de tumor [72].

III.6 E7 de VPH regula la expresión de genes celulares por mecanismos epigenéticos

Se ha reportado que, en muestras que van desde cérvix normal a muestras de CaCu, los VPHs tipos 16 y 18 no solo activan la maquinaria de metilación celular para metilar el

DNA viral, sino que también se ha observado metilación en las regiones promotoras de los genes celulares *CCNA1*, *C13ORF18*, *RARβ2*, *CDH1*, *DAPK1*, *hTERT1*, *hTERT2*, *HIC1* y *TWIST1* [76]. Por lo tanto, la evidencia previa sugiere que E7 de VPH-AR tiene un papel importante en la activación de la maquinaria de metilación celular, regulando la transcripción de genes virales y celulares, ya sea durante la infección productiva del ciclo de vida del VPH o durante el proceso carcinogénico; sin embargo, los mecanismos por los cuales E7 podría estar involucrado en la regulación de la expresión génica a nivel de cromatina son poco conocidos.

En este sentido, se ha observado que una característica común de varios tipos de cáncer asociados con virus es la disminución de la expresión de *CDH1*, que codifica para E-cadherina, a través de mecanismos epigenéticos [77-79]. En el caso de los cánceres asociados con infecciones por VPH, se ha demostrado que E7 de VPH16 suprime la transcripción del gen *CDH1*, reduciendo la expresión de la proteína E-cadherina [80, 81]. Además, se ha reportado, en un modelo de células NIKS que se derivan de queratinocitos de prepucio, y células NIKS transfectadas ya sea con E7 de VPH16 (NIKS+E7) o con DNA episomal de VPH16 (NIKS+VPH16) que, E7 de VPH16 aumenta la expresión y la actividad de Dnmt1 [81]; sin embargo, las células NIKS no infectadas con VPH16 (NIKS) y NIKS+VPH16 no mostraron diferencias en el patrón de metilación de los sitios CpGs en las regiones promotoras de *CDH1*, ya que todos los sitios CpGs tanto en las células NIKS como en las células NIKS+VPH16 estaban desmetilados [81]. En este punto, es evidente que el VPH activa la maquinaria de metilación a través del complejo E7/Dnmt1; sin embargo, no está claro cómo el VPH induce la represión de *CDH1* por mecanismos epigenéticos.

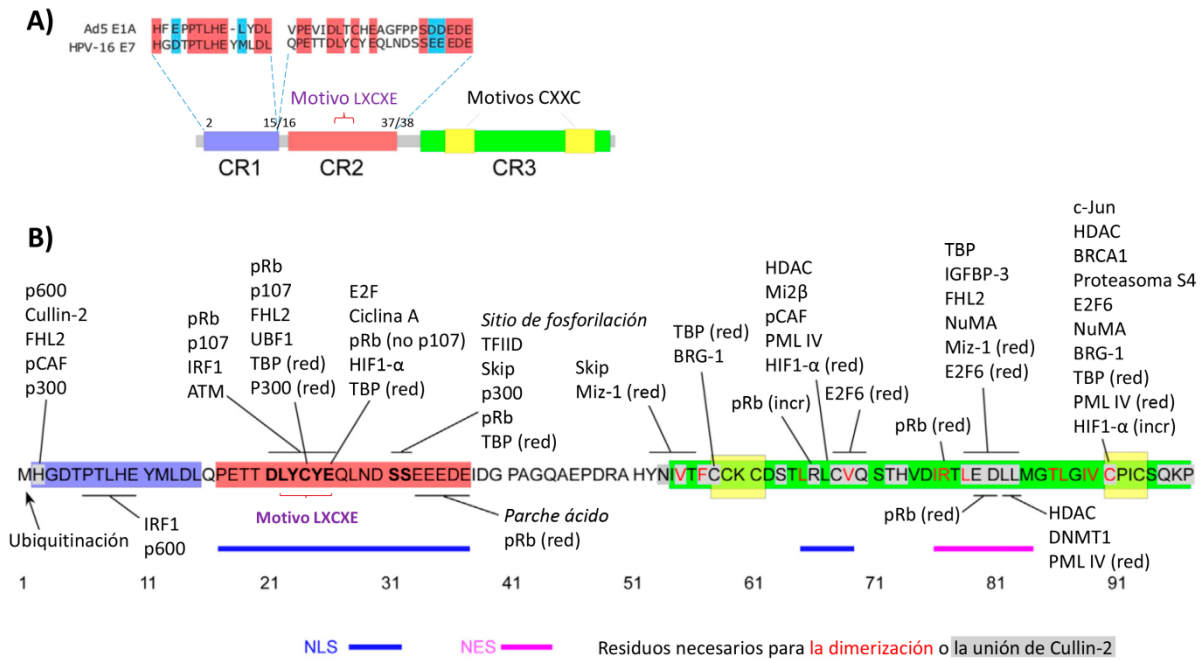


Figura 4. - Representación esquemática de la oncoproteína E7 de VPH16. A) Se visualizan los 37 residuos de aminoácidos del extremo amino de E7 conformado por las regiones CR1 (azul) y con CR2 (rojo), las cuales tienen similitud de secuencia con las regiones CR1 y CR2 de la proteína E1A del Adenovirus (Ad5), y se visualiza la región CR3 (verde) de E7, junto con los motivos CXXC (amarillo). Los residuos de aminoácidos idénticos y químicamente similares entre E7 de HPV16 y E1A de Ad5 están resaltados por recuadros rojos y azules, respectivamente. Las secuencias de CR1 son necesarias para la transformación celular y para la degradación de pRb, pero no contribuyen directamente a la unión de pRb. Las secuencias en CR2 incluyen el núcleo de sitio de unión a pRb (motivo LXCXE), que es necesario para la transformación celular, así como un sitio de fosforilación consenso de *caseína quinasa II* (CKII). La región carboxilo terminal de E7 (verde) (CR3) contiene un motivo de unión a un metal que puede funcionar como un dominio de dimerización e interviene en la asociación con múltiples proteínas celulares del huésped, incluidas las enzimas modificadoras de histonas, que también pueden contribuir en la transformación celular. B) Se muestran los sitios de interacción en E7 con reguladores transcripcionales conocidos. Los números 1 a 91 representan posiciones de aminoácidos. En algunos casos, la unión con reguladores transcripcionales puede estar reducida (indicada como “red”) o incrementada (indicada como “incr”) por la mutación de un residuo específico. Se indica la ubicación de la secuencia de localización nuclear (NLS) (líneas azules) y la secuencia de exportación nuclear (NES) (línea rosa). Los residuos de aminoácidos en color rojo son importantes para la dimerización y los residuos sombreados de gris son importantes para la unión de cullin-2 [49, 53, 58].

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que se ha demostrado que E7 de VPH-AR interactúa y activa a Dnmt1 y HDAC1, nos planteamos lo siguiente ¿E7 de VPH regula negativamente la expresión de CDH1 por algún mecanismo epigenético o por inducción de reguladores negativos de la expresión de *CDH1*?

V. HIPÓTESIS

La oncoproteína E7 de VPH-AR regula negativamente la expresión de *CDH1* a través de dos vías: a) por un mecanismo epigenético, que involucra la metilación del DNA, y b) por una vía que es independiente de los mecanismos epigenéticos, por ejemplo, por inducción de reguladores negativos de la expresión de *CDH1*, tales como los represores transcripcionales Snai1 y Snai2 de la familia Snail.

Para el presente estudio, las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski fueron seleccionadas, ya que son representativas de los tipos de cáncer más frecuentes del cuello uterino, y que además, poseen diferente carga viral y origen epitelial, por ejemplo: HeLa es un adenocarcinoma de cuello uterino que contiene de 10 a 50 copias del genoma de VPH-18 integradas por célula; SiHa es un carcinoma de células escamosas que contiene de 1 a 2 copias del genoma de VPH16 integradas por célula; y Ca Ski es un carcinoma epidermoide de cuello uterino que contiene de 500 a 600 copias del genoma de VPH16 integradas por célula [82-88].

VI. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* en líneas celulares positivas para VPH16 (SiHa y Ca Ski) y VPH18 (HeLa), y su asociación con los factores de transcripción Snai1 y Snai2, que son reguladores negativos de la expresión de *CDH1* e inductores del proceso de transición epitelio-mesenquima (TEM) [89].

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el patrón de metilación en la región promotora del gen *CDH1*, que codifica para E-Cadherina, en las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski, positivas a VPH-AR, y en la línea celular HaCaT, la cual es negativa a VPH.
2. Determinar el patrón de metilación en la región promotora del gen *CDH1* en las líneas celulares HeLa y SiHa tratadas con 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC) o con tricostatina A (TSA).
3. Determinar el patrón de metilación en la región promotora del gen *CDH1* en las líneas celulares HeLa y SiHa transfectadas con siRNA contra E7 de VPH 16 y 18.
4. Determinar el nivel de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA y proteína en las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski, positivas a VPH-AR, y en la línea celular HaCaT, la cual es negativa a VPH.
5. Determinar el nivel de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA y proteína en las líneas celulares HeLa y SiHa tratadas con 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-dC) o con tricostatina A (TSA).
6. Determinar el nivel de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA y proteína en las líneas celulares HeLa y SiHa transfectadas con siRNA contra E7 de VPH 16 y 18.
7. Relacionar si E7 de VPH induce cambios en el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1*.
8. Relacionar si E7 de VPH induce cambios en el nivel de expresión de *CDH1* y en los reguladores negativos de la expresión de *CDH1*, tales como los represores transcripcionales Snai1 y Snai2 de la familia Snail.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII. 1 Líneas celulares

Según como fue reportado por la *American Type Culture Collection* (ATCC), HeLa es una línea celular derivada de un adenocarcinoma de cuello uterino de una mujer afroamericana y que contiene de 10 a 50 copias del genoma de VPH18 integradas por célula [82, 84, 85, 87, 88, 90, 91]. SiHa es una línea celular derivada de un carcinoma grado II de células escamosas de cuello uterino de una mujer asiática y que contiene de 1 a 2 copias del genoma de VPH16 integradas por célula [82-84, 90]. Ca Ski es una línea celular derivada de un carcinoma epidermoide de cuello uterino de una mujer caucásica y que contiene de 500 a 600 copias del genoma de VPH16 integradas por célula [82, 86, 90]. Por otro lado, HaCaT es una línea celular epidérmica humana inmortalizada no tumorigénica derivada de queratinocitos de la piel. Todas las líneas celulares se autenticaron mediante perfiles de STR DNA (número de identificación DP0297) por el Centro de Secuenciación y Análisis de DNA de la Universidad de Colorado (Denver, CO, USA). Las líneas celulares HeLa, SiHa y HaCaT se cultivaron en DMEM (no. de cat. 12800-058; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Las células de Ca Ski se cultivaron en RPMI (no. de cat. 31800-014; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Todas las líneas celulares fueron suplementadas con suero fetal bovino al 10% (SFB; no. de cat. 16000-044; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y penicilina-estreptomicina a 1x (no. de catálogo 15140122; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y fueron incubadas en una cámara humidificada a 37 °C con tensión de CO₂ al 5% en una incubadora de CO₂ SANYO MCO-19AIC-UVH.

Las células MCF-7, una línea celular derivada de un adenocarcinoma de mama, no transfectadas y las clonas estables de células MCF-7 transfectadas con un vector de expresión pcDNA 3.1 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc) con la región bisitrónica E6/E7 de VPH18 (MCF-7 pE6/E7) fueron proporcionadas por el Dr. Erick de la Cruz Hernández de la Universidad Autónoma Juárez de Tabasco, y fueron cultivadas con 800 µg/mL de geneticina en medio DMEM/F12 por 3 semanas como previamente fue descrito [92-94]. Por otro lado, las células C33-A, una línea celular que deriva de un carcinoma de útero y cérvix negativa a VPH, no transfectadas y las clonas de C33-A establemente transfectadas con un plásmido pcDNAE7 (C33-A pE7/HPV16) fueron proporcionadas por el Dr. Patricio Gariglio del CINVESTAV-IPN, y fueron cultivadas con 800 µg/mL de geneticina en medio DMEM por 2 semanas como previamente fue reportado [95].

VIII. 2 Tratamientos con 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AzadC) y tricostatina A (TSA)

La 5-AzadC causa la desmetilación o hemi-desmetilación del DNA, que da como resultado la activación del gen por efecto de la inhibición de la actividad de la DNA metiltransferasa [96]. La TSA se ha utilizado como un inhibidor de la desacetilasa de histona, dando lugar a la hiperacetilación de las histonas y por consiguiente a la relajación de la cromatina y la modulación de la expresión génica [97]. Tanto la 5-AzadC y el TSA fueron adquiridas con Sigma-Aldrich (Merck KGaA; no. de cat. A3656 y T8552, respectivamente) y fueron resuspendidas en DMSO grado Biología Molecular (Sigma-Aldrich; Merck KGaA; no. de cat. D8418) para obtener un stock de trabajo de 5-AzadC a 10.0 mM y un stock de trabajo de TSA de 1.0 mM. Los stocks de trabajo de 5-AzadC y TSA fueron alicuotados, se protegieron de la luz y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

Por triplicado, se sembraron 450,000 células de HeLa y 500,000 células de SiHa en cajas p60 y luego se trataron con 5 y 10 µM de 5-azadC y con 200 y 500 nM de TSA. Las células no tratadas (NT) o las células sometidas a tratamiento con DMSO se usaron como controles. El volumen total de medio de cultivo fue de 3 mL suplementado con 10% de SFB y sin antibióticos. Los ensayos se realizaron protegidos de la luz y las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió a las 24 h debido a la vida media del 5-AzadC y TSA.

VIII. 3 Transfección de RNA pequeño de interferencia sintético (siRNA)

Los siRNAs dirigidos contra E7 de VPH16 y VPH18 se diseñaron tal como fueron reportados en publicaciones previas [98, 99] (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.; IDs s237642 y s237640, respectivamente). La secuencia de siRNA contra el gen control de GAPDH se obtuvo de Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc. (Silencer® Select GAPDH siRNA (Hs, Mm, Rn); cat. no. 4390849). Los siRNAs se resuspendieron en agua destilada libre de DNAasa/RNAasa UltraPure™ (no. de cat. 10977-015; Thermo Fisher Scientific, Inc) para obtener un stock de trabajo de 10 µM. Los siRNAs se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

La transfección con los siRNAs se realizó por triplicado utilizando el kit siPORT™ NeoFX™ (no. de cat. AM4511; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En cada pozo se sembraron 75,000 células de HeLa y 80,000 células de SiHa en una placa de cultivo celular de 12 pozos. Las células HeLa se transfectaron luego con 30 nM de siRNA contra E7 de VPH18 y las células SiHa se

transfectaron con 30 nM de siRNA contra E7 de VPH16. Por otro lado, 30 nM de siRNA dirigido a GAPDH se transfectó como un control positivo de transfección para ambas líneas celulares. Se usaron células no transfectadas (NT) o células sometidas a tratamiento con el agente de transfección siPORT™ NeoFX™ con medio Opti-MEM® I como controles de referencia para obtener los valores relativos; por otro lado, las células no transfectadas fueron usadas como control de referencia para la comparación de datos estadísticos. El volumen final de medio de cultivo de transfección fue de 1.2 mL, suplementado con 12% de SFB y sin antibióticos. Las células se incubaron durante 48 horas a 37°C con 5% de tensión de CO₂. La eficiencia de transfección fue determinada midiendo la expresión de E7 y GAPDH a nivel de mRNA.

VIII. 4 Modificación con bisulfito de sodio y análisis de metilación del DNA

El DNA genómico de las líneas celulares procedentes de los ensayos de los tratamientos con 5-AzadC y TSA y de las transfecciones con siRNAs se aisló utilizando el kit de purificación de DNA genómico The Wizard®, y se trataron 1.5 µg del DNA genómico con bisulfito de sodio, de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit EZ DNA Methylation-Gold™ (no. de cat. D5006; Zymo Research Corp.). La metilación de los sitios CpGs en la región promotora de *CDH1* se analizó mediante el protocolo BSP (*Bisulfite Sequencing PCR*, PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio) [26-30] o usando oligonucleótidos para el protocolo de PCR específica de metilación (MSP) proporcionados por el Dr. Alonso Dueñas González (INCan-UNAM); las condiciones de PCR para el protocolo de MSP fueron las mismas a las empleadas en el protocolo de BSP. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25 µL, que contenía 1x del PCR Gold Buffer, 1 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 10 pMol de cada oligonucleótido fCDH1-BSP y rCDH1-BSP (las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla I), y 1 unidad de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (no. de cat. 4338856; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), y 300 ng del DNA modificado con bisulfito. Las condiciones de corrimiento de la PCR fueron: 95 °C durante 7 min, seguido de 35 ciclos (a 95 °C durante 35 segundos, 57 °C durante 35 segundos y 72 °C durante 60 segundos), con una etapa final de extensión de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR fueron tratados usando *ExoI* (no. de cat. EN0581) y *SAP* (no. de cat. EF0651). Finalmente, los productos de PCR tratados se marcaron utilizando el kit BigDye® v3.1 Cycle Sequencing (no. de cat. 4337455; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) según las especificaciones del fabricante. Los

productos de PCR marcados fueron analizados en el equipo ABI PRISM™ 3100-Avant (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Los oligonucleótidos para BSP fueron diseñados utilizando el software MethPrimer v2.0 (The Li Lab; PUMCH; Chinese Academy of Medical Sciences) utilizando la secuencia de GenBank DQ335132.1 para el gen *CDH1* [100]. Los datos de secuenciación obtenidos por BSP fueron visualizados utilizando el software Chromas v2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.) y fueron analizados con los programas de paquete informáticos Lasergene v7 (DNASTAR, Inc.).

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos usados para los ensayos de BSP y qPCR en diferentes blancos genéticos.

Nombre del gen	Tipo de ensayo	Secuencia de los oligonucleótidos (5'→3')
<i>CDH1</i>	BSP	Forward TTTTAGTAATTTTAGGTTAGAGGGTTAT Reverse AAACTCACAAATACTTTACAATTCC
<i>CDH1</i>	qPCR	Forward GTCAGTTCAGACTCCAGCCC Reverse AAATTCAGTCTGCCAGGACG
<i>SNAI1</i>	qPCR	Forward ACCACTATGCCGCGCTCTT Reverse GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
<i>SNAI2</i>	qPCR	Forward GACCCTGGTTGCTTCAAGGA Reverse TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA
<i>E7 de VPH16</i>	qPCR	Forward CAGCTCAGAGGAGGAGGATG Reverse TGCCCATTAACAGGTCTTCC
<i>E7 de VPH18</i>	qPCR	Forward TGAAATTCGGTTGACCTTC Reverse CACGGACACACAAAGGACAG
<i>GAPDH</i>	qPCR	Forward AAGGTCGGAGTCAACGGATTTG Reverse CCATGGGTGGAATCATATTGGAA
<i>HPRT</i>	qPCR	Forward GGACTAATTATGGACAGGACTG Reverse GCTCTTCAGTCTGATAAAATCTAC

PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio (BSP), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

VIII. 5 Extracción de RNA, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Las líneas celulares que fueron tratadas con 5-AzadC y TSA, así como las líneas celulares que fueron transfectadas con siRNAs, fueron sometidas a extracción de RNA total utilizando TRIzol® Reagent (no. de cat. 15596026; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), posteriormente, el RNA total se trató con *DNase I* (no. de cat. EN0521; Invitrogen; Thermo

Fisher Scientific, Inc.) y se purificó con Direct-zol™ RNA MicroPrep (no. de cat. R2060; Zymo Research Corp.) de acuerdo con el protocolo del fabricante, esto con la finalidad de eliminar el DNA genómico residual y limpiar las reacciones enzimáticas que pudieran estar presentes en el RNA.

El DNA complementario (cDNA) se obtuvo a partir del RNA purificado utilizando el kit de SuperScript™ IV First-Strand Syntesis (no. de cat. 18091050; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) según las especificaciones del fabricante. Posteriormente, 60 ng de cDNA se sometieron a qPCR para determinar los niveles de expresión de los genes de interés utilizando los cebadores enumerados en la Tabla I. Las condiciones de la qPCR utilizadas incluyeron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de tres pasos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 35 segundos, y un paso final de extensión a 72 °C durante 7 minutos, seguido de un análisis de curva de fusión de 65-95 °C. Todos los ensayos de la qPCR se procesaron en el equipo Rotor-Gene Q Series (Qiagen, Inc.) y se analizaron en el software Rotor-Gene Q Series v2.1.0 (Qiagen, Inc.).

Para obtener los valores de los niveles de expresión de los genes *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *E7* de VPH16 y *E7* de VPH18 en las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y HaCaT, se usó una muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH (Human Cervix Total RNA, no. de cat. AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) como referencia para obtener los valores relativos. Los valores de ΔC_t de cada gen se normalizaron con el gen de referencia GAPDH utilizando el método de Livak ($2^{\Delta\Delta C_q}$) [101]; el valor relativo de 1 para la muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH no se graficó en la Fig. 7A. Para el análisis estadístico, la línea celular HaCaT se usó como referencia para la comparación, debido al hecho de que estas células son células epidérmicas humanas inmortalizadas no tumorigénicas.

Para los experimentos que involucran el tratamiento de células HeLa y SiHa con 5-AzadC y TSA, las células tratadas con DMSO se utilizaron como referencia para obtener el valor relativo; sin embargo, el valor relativo de 1 obtenido de estas células no se representó en la Fig. 8. Para los experimentos que involucran la transfección de células HeLa y SiHa con siRNAs, las células tratadas con el agente de transfección siPORT™ NeoFX™ con medio Opti-MEM® I se utilizaron como referencia para obtener el valor relativo; sin embargo, el valor relativo de 1 obtenido de estas células no fue representado en la Fig. 9. Los valores de ΔC_t de los genes *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *E7* de VPH16 y *E7* de VPH18 se normalizaron

utilizando el método Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) [101] utilizando el gen de referencia *GAPDH* para los ensayos de tratamientos 5-AzadC y TSA y el gen de referencia *HPRT* para los experimentos que involucran transfección con siRNAs. Para el análisis estadístico, se usaron células HeLa y SiHa no tratadas (NT) como las referencias para las comparaciones.

VIII. 6 Extracción de proteínas y análisis de Western blot

Las proteínas se obtuvieron utilizando un buffer de lisis que contiene 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 5 mM de Tris-HCl a pH 9.0, 1% de Nonidet-P40 y 1.2 mg/mL del cóctel inhibidor de proteasas cOmplet™ (Roche Applied Science). Los extractos de proteína fueron forzados diez veces a través de una aguja de calibre 22 y se centrifugaron durante 10 minutos a 17,000 x g a 4 °C. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford. Posteriormente, se cargaron 30 mg de proteína y se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12%, seguido de transferencia en membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó por 1 hora con una solución que contenía 5% de leche en polvo sin grasa diluida en TBS 1x con 0.1% de Tween-20 (TBST) a 4 °C con agitación suave. Las membranas fueron incubadas toda la noche en TBST con las diluciones de anticuerpos contra: E-cadherina (no. de cat. Sc-8426; a una dilución de 1: 1,000), GAPDH (no. de cat. Sc-48167; a una dilución de 1: 1,000) y β -actina (no. de cat. Sc-1616; a una dilución de 1: 1,000), los cuales fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. Para el caso de los anticuerpos contra Snai1 (no. de cat. L70G2; a una dilución de 1: 1,000) y Snai2 (no. de cat. C19G7; a una dilución de 1: 1,000), estos fueron obtenidos de Cell Signaling Technology, Inc., y las membranas fueron incubadas durante toda la noche con las diluciones de anticuerpo en TBST con 5% de BSA (no. de cat. 9998; Cell Signaling Technology, Inc).

Los anticuerpos secundarios goat anti-mouse IgG-HRP (no. de cat. sc-2005; a una dilución de 1: 10,000) y donkey anti-rabbit IgG-HRP (no. de cat. sc-2313; a una dilución de 1: 10,000) y donkey anti-goat IgG-HRP (no. de cat. sc-2020; 1: 5,000) fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., fueron diluidos en TBST con 5% de leche en polvo sin grasa e incubados durante dos horas a temperatura ambiente.

Se utilizó el sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP (EMD Millipore) para la detección de proteínas, la inmunodetección se visualizó con el equipo de escáner C-DiGit Blot (Li-Cor Biosciences); y las imágenes inmunodetectadas fueron procesadas con el software Image Studio™ Lite v5.2 (Li-Cor Biosciences).

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con dos anticuerpos primarios de la siguiente manera: (i) la incubación se realizó como se detalla previamente contra un anticuerpo primario seleccionado de E-cadherina, Snai1 o Snai2 con su respectivo anticuerpo secundario, (ii) la imagen se adquirió en el escáner C-DiGit Blot, posteriormente (iii) se realizaron tres lavados durante 5 minutos con TBST, y (iv) la membrana se volvió a incubar contra un segundo anticuerpo primario seleccionado de GAPDH o β -actina con su respectivo anticuerpo secundario como se especificó previamente, (v) la inmunodetección se realizó en el escáner C-DiGit Blot.

VIII. 7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, Inc.). ANOVA de una vía con prueba Turkey post hoc fue usada para evaluar diferencias significativas en el nivel de expresión génica y niveles de metilación para los tratamientos con 5-AzadC, TSA y siRNA. Los resultados se presentaron como media \pm DS. Se consideró una $p < 0.05$ para indicar una diferencia estadísticamente significativa.

IX. RESULTADOS

IX. 1 Diferentes patrones de metilación en la región promotora de CDH1 están presentes en las líneas celulares de cáncer positivas a VPH tipo 16 y 18

Se detectó un patrón de metilación sitio específico común en ciertas islas CpGs (-160, -150, -131 y -122) de la región promotora de *CDH1* en líneas celulares HeLa y SiHa. Otras islas CpGs fueron identificadas (-45, -136, -105, -103, -83, -57, -52, -45, -36, -13, +6 y +9) que están metiladas únicamente en la línea celular HeLa. Notablemente, la línea celular Ca Ski no mostró metilación de ninguno de los 17 sitios CpG del promotor de *CDH1* que fueron analizados (Fig. 5B). La cuantificación de los niveles de metilación en la región promotora de *CDH1* indicó que las células HeLa presentaron una frecuencia de metilación del 88.24%, las células SiHa exhibieron una frecuencia de metilación del 17.65% y las células de Ca Ski demostraron una frecuencia del 0% (Fig. 5C).

Con base en el hallazgo de estudios previos [80, 81, 86, 89], nuestros primeros ensayos se realizaron utilizando las líneas celulares C33-A, C33-A transfectadas con pE7/VPH16 (C33-A pE7/VPH16), MCF-7 y MCF-7 transfectadas con pE6/E7 de VPH18 (MCF-7 pE6/E7) como modelos de cáncer negativos para VPH. La validación de la selección de clones estables de las células C33-A y MCF-7 transfectadas con pE7/VPH16 y con pE6/E7 de VPH18 respectivamente, se realizó evaluando la expresión de E7 a nivel de mRNA por RT-PCR (Fig. 6B). Sin embargo, C33-A en comparación con C33-A pE7/VPH16 y MCF-7 en comparación con MCF-7 pE6/E7 no mostraron diferencias en el estado de metilación de sus regiones promotoras de *CDH1* (Fig. 6A) o en la expresión de E-cadherina a niveles de mRNA y proteínas (Fig. 6B y C). Debido a que la línea celular MCF-7 es un adenocarcinoma que se deriva de la glándula mamaria y tiene un fenotipo epitelial con un alto nivel de expresión de *CDH1* similar al observado en la línea celular Ca Ski, y debido a que la línea celular C33-A originalmente no expresa *CDH1*, las líneas celulares C33-A y MCF7 se eliminaron del presente estudio debido a que no fue posible correlacionar el efecto de la oncoproteína E7 en la supresión de la expresión de *CDH1*, ni en los patrones de metilación en la región promotora de *CDH1*.

IX. 2 Los niveles de metilación en la región promotora de CDH1 se asocian con los niveles de expresión de mRNA y proteína de CDH1.

El análisis de la expresión de *CDH1* en las diferentes líneas celulares mostró una disminución significativa del nivel de mRNA de *CDH1* en las líneas celulares HeLa ($P < 0.001$)

y SiHa (P<0.01) en comparación con la línea celular HaCaT (Fig. 7A). Se observó una disminución similar a nivel de proteína (Fig. 7B). En contraste, la línea celular Ca Ski mostró una alta expresión de *CDH1*, similar a la línea celular control HaCaT, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig. 7A y B).

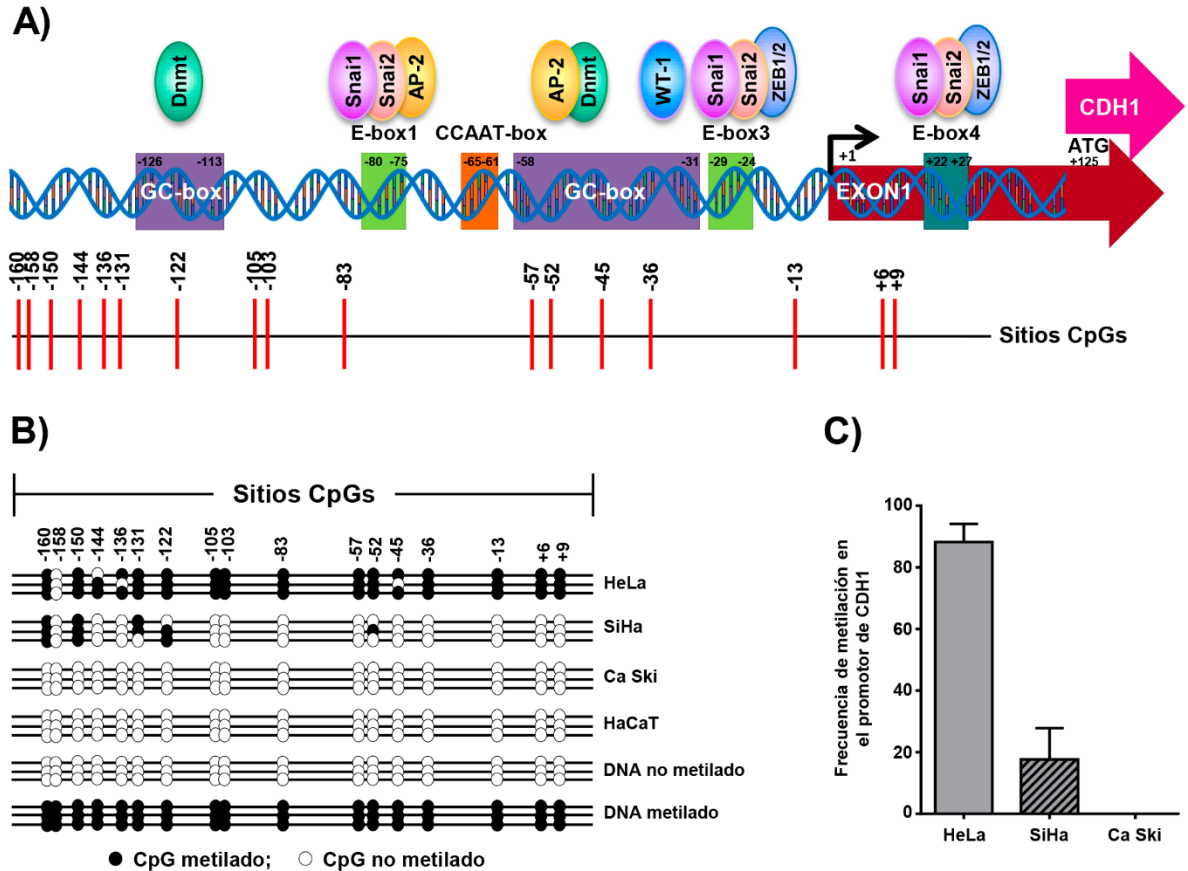
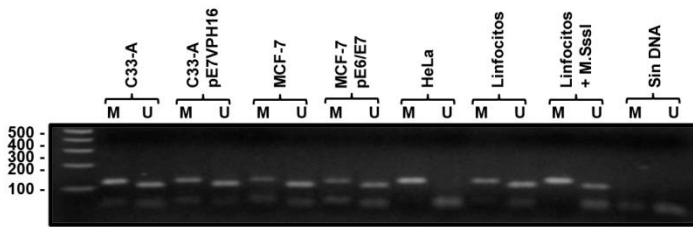
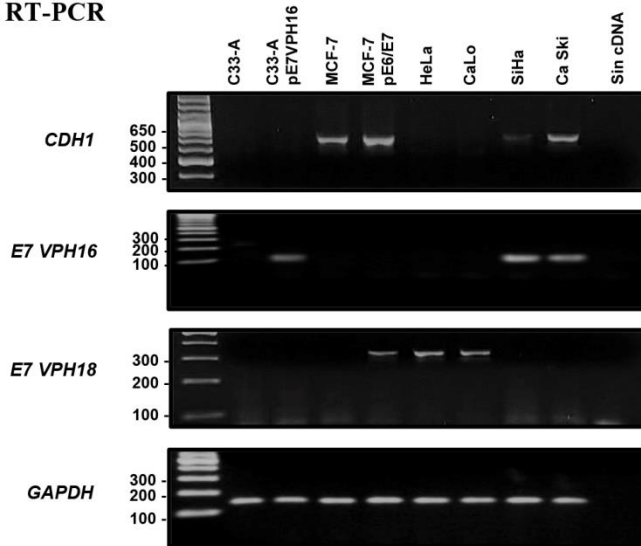


Figura 5. Diferencias en el patrón de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en diferentes líneas celulares. En (A) se muestra la ubicación de diferentes elementos tales como motivos E-box y GC-box que regulan la transcripción en la región promotora del gen *CDH1*, las líneas verticales en rojo indican cada sitio CpG contenido en la región promotora de *CDH1*. En (B) se muestra un diagrama de metilación tipo lollipop de secuenciación de la región promotora de *CDH1* en líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski que derivan de diferentes tipos de cáncer de cuello uterino y que son positivas a VPH-AR; y de HaCaT, que es una línea celular no tumorigénica de queratinocitos humanos immortalizados; así como de un control negativo a metilación, DNA de linfocitos humanos (DNA no metilado); y de un control positivo a metilación, DNA de linfocitos humanos tratados con la metilasa M.SssI (DNA metilado). Un círculo negro (●) indica una CpG metilada y un círculo blanco (○) indica una CpG no metilada. En (C) se muestra la cuantificación de la frecuencia de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski.

A) MSP para *CDH1*



B) RT-PCR



C) Western blot

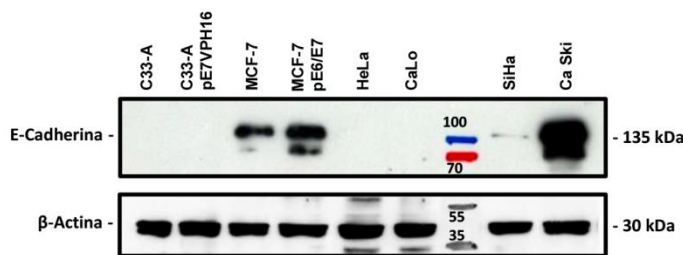


Figura 6. Estado de metilación de la región promotora del gen *CDH1* y expresión a nivel de mRNA y proteína de *CDH1* en las líneas celulares C33-A y MCF-7. En (A) se muestra el estado de metilación para la región promotora de *CDH1* determinada por la técnica de MSP (PCR específica de metilación) en las líneas celulares C33-A y MCF-7, así como en las transfecciones C33-A pE7/VPH16 y MCF-7 pE6/E7. El DNA de linfocitos fue utilizado como control negativo de metilación, y el DNA de la línea celular HeLa y el DNA de linfocitos tratados con la metilasa *M.SssI* fueron utilizados como controles positivos de metilación. En (B) se muestra el nivel de expresión de mRNA para *CDH1* (E-cadherina) y *GAPDH* mediante la técnica de retro-transcripción-PCR (RT-PCR). Se detectó el mRNA de *E7* de VPH tipo 16 y 18 con la finalidad de determinar la eficiencia de transfección de las líneas celulares C33-A pE7/VPH16 y MCF-7 pE6/E7. Las líneas celulares HeLa, CaLo, SiHa y Ca Ski se utilizaron como controles positivos de expresión de *E7*. En (C) se muestra la expresión a nivel de proteína de E-cadherina y β -actina mediante la técnica de Western blot.

IX. 3 El nivel de expresión de *CDH1* está asociado con el nivel de expresión de *SNAI1*.

El presente estudio midió la expresión de *SNAI1* y *SNAI2* para probar la hipótesis de que la expresión de *CDH1* está regulada por los factores de transcripción Snai1 y Snai2, que son mediadores de la TEM al regular negativamente la expresión de *CDH1* [89, 102-104]. Los resultados revelaron que el nivel de expresión de *SNAI1* está incrementado significativamente a nivel de mRNA en HeLa ($P < 0.0001$) y en células SiHa ($P < 0.001$), pero está reducido significativamente en células Ca Ski ($P < 0.01$) en comparación con las células

HaCaT (Fig. 7A). Notablemente, se observó que este resultado se vio reflejado a nivel de proteína también (Fig. 7B). No se observaron diferencias significativas en la expresión de *SNAI2*, tanto en los niveles de mRNA (Fig. 7A) como de proteína (Fig. 7B) entre todas las líneas celulares. Dado que la línea celular Ca Ski presenta un fenotipo no mesenquimático y un alto nivel de expresión de E-cadherina, con baja expresión de *Snai1* y *Snai2*, se decidió no continuar con futuros análisis en el presente estudio de esta línea celular.

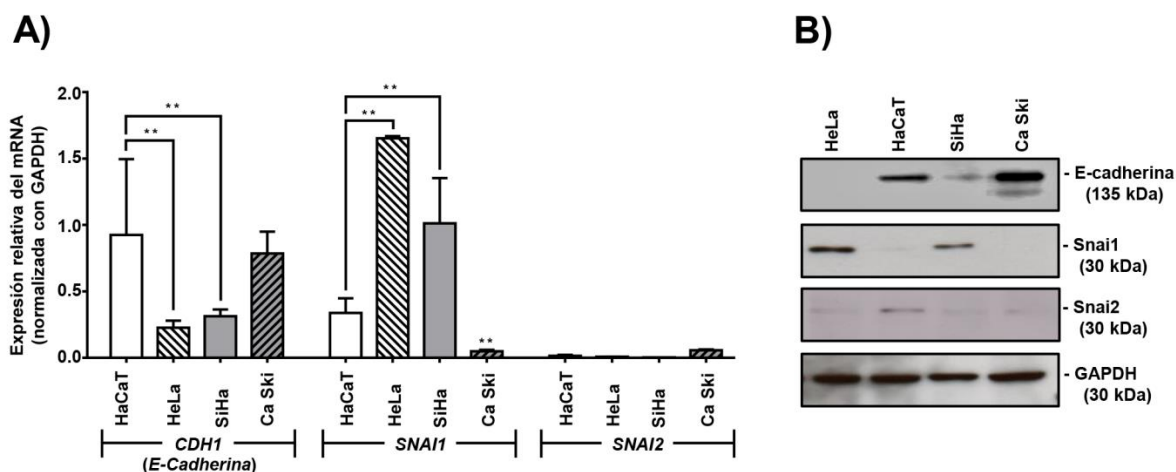


Figura 7. Diferencias en la expresión a nivel de mRNA y proteína de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y HaCaT. (A) Una PCR cuantitativa fue realizada para medir el nivel de expresión del mRNA de los genes *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en las líneas celulares indicadas. Los valores de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ son en relación con la línea celular HaCaT. En (B) se muestra la expresión de proteínas de E-cadherina, Snai1 y Snai2 evaluadas por Western blot en las líneas celulares antes indicadas. GAPDH se utilizó como control de carga.

IX. 4 Los tratamientos con 5-AzadC y TSA ejercen un efecto sobre el patrón de metilación y sobre la reexpresión de *CDH1*.

Las líneas celulares HeLa y SiHa fueron tratadas con diferentes concentraciones de 5-AzadC y TSA, seguido de un análisis de los niveles de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2*. Las células HeLa y SiHa tratadas con el vehículo (DMSO) se utilizaron para normalizar los valores de expresión relativa, así como para realizar comparaciones en el análisis estadístico.

Los resultados demostraron que en la línea celular HeLa, el patrón de metilación se mantuvo en los sitios CpG -103, -105 y -160 de la región promotora de *CDH1* después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA. Por el contrario, en la línea celular SiHa, esta región se

desmetiló completamente en los tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M y TSA a una concentración de 500 nM y solo el sitio CpG -52 se mantuvo metilado después del tratamiento con TSA a 200 nM (Fig. 8A y C). En términos de nivel de metilación posterior al tratamiento y teniendo como referencia las líneas celulares HeLa y SiHa no tratadas, se observó en la línea celular HeLa, una disminución en la metilación del 76.48% en ambos tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M, mientras que con los tratamientos con TSA a 200 y 500 nM se observó una disminución en la metilación del 68.63%. Por el contrario, en la línea celular SiHa, se observó una disminución del 21.57% con los tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M y el tratamiento con TSA a 500 nM, mientras que con el tratamiento con TSA a 200 nM se observó una disminución en la metilación del 17.65%. En este sentido, se demostró en ambas líneas celulares, que el tratamiento con 5-AzadC y TSA disminuyó significativamente el nivel de metilación ($P < 0.001$, Fig. 8B y D). Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos (5-AzadC y TSA) en el efecto de disminuir los niveles de metilación en la región promotora de *CDH1*.

Por otro lado, en la línea celular HeLa, los tratamientos con 5-AzadC a 10 μ M ($P = 0.004$) y TSA a 500 nM ($P = 0.03$) aumentaron significativamente la expresión de *CDH1* tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig. 9A y G). Además, TSA a 500 nM aumentó significativamente la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA ($P = 0.01$; Fig. 9B) en células HeLa sin cambios aparentes a nivel de proteína (Fig. 9I). En la línea celular SiHa, la expresión de *CDH1* aumentó significativamente a nivel de mRNA con 5-AzadC a 5 y 10 μ M ($P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente) o con TSA a 500 nM ($P = 0.004$) (Fig. 9D); un efecto similar a nivel de proteína fue observado (Fig. 9H). Conjuntamente, la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA aumentó significativamente con 5-AzadC a 10 μ M ($P = 0.004$) y TSA a 500 nM ($P = 0.01$) (Fig. 9E) sin cambios aparentes a nivel de proteína (Fig. 9J), similar a lo observado en HeLa.

Notablemente, se observó que los tratamientos con 5-AzadC y TSA también aumentaron los niveles de expresión de mRNA de *SNAI1* en las líneas celulares HeLa (Fig. 9B) y SiHa (Fig. 9E); sin embargo, no se observaron cambios aparentes a nivel de proteína en ambas líneas celulares (Fig. 9I y J). La expresión de *SNAI2* no se modificó significativamente a nivel de mRNA bajo cualquier condición de tratamiento en ambas líneas celulares (Fig. 9C y F).

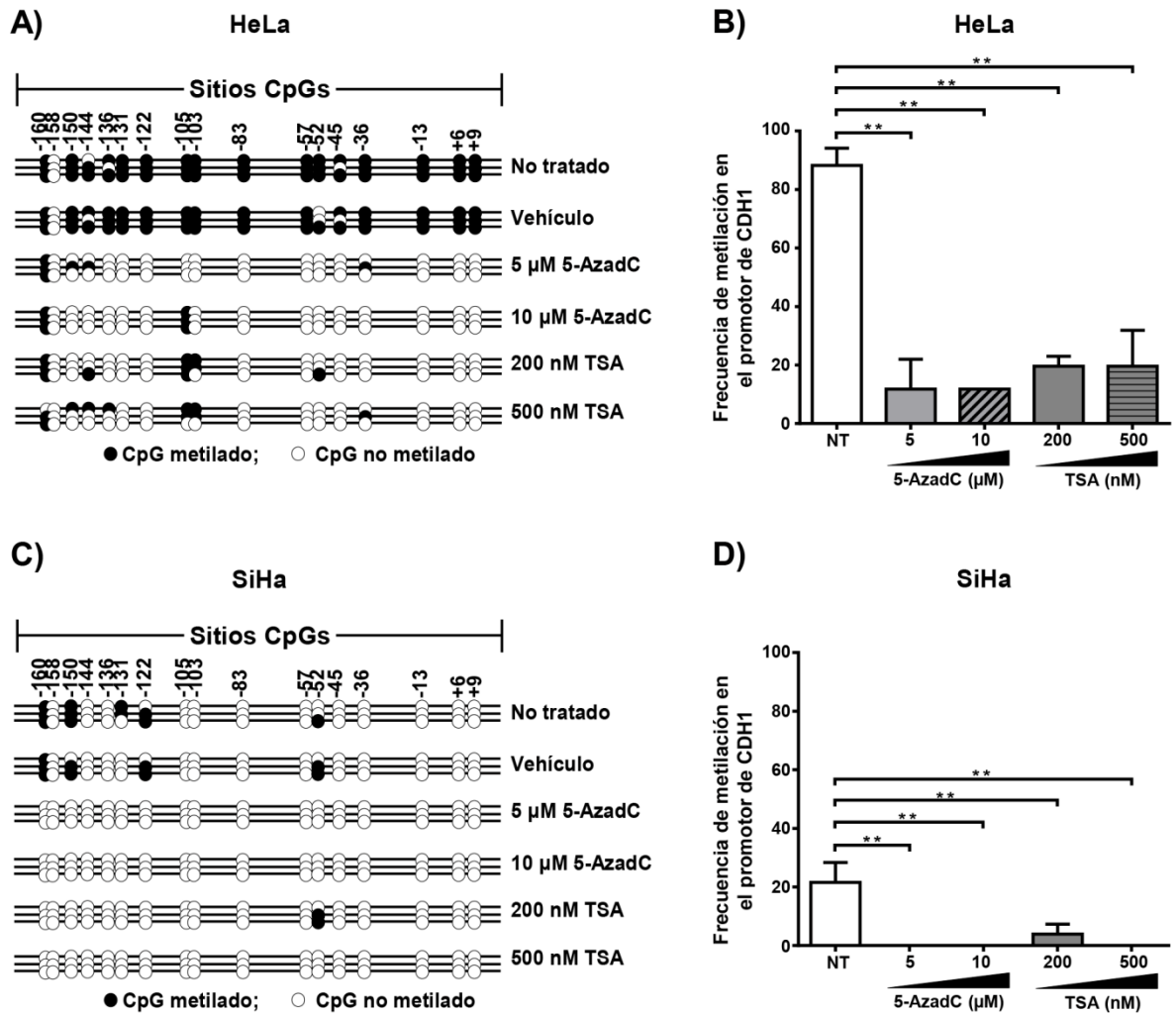


Figura 8. Cambios en el patrón de metilación del promotor de *CDH1* en líneas celulares HeLa y SiHa después del tratamiento con 5-AzadC y TSA. Diagramas de metilación tipo lollipop muestran los cambios en el patrón de metilación en los sitios CpG de la región promotora de *CDH1* en las líneas celulares (A) HeLa y (C) SiHa después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA en comparación con las células no tratadas (NT) y tratadas con vehículo. Un círculo negro (●) indica una CpG metilada y un círculo blanco (○) indica una CpG no metilada. Cuantificación de la frecuencia de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares (B) HeLa y (D) SiHa después del tratamiento con las concentraciones indicadas de 5-AzadC y TSA en comparación con las células NT. *P<0.05, **P<0.01 frente a células no tratadas (NT).

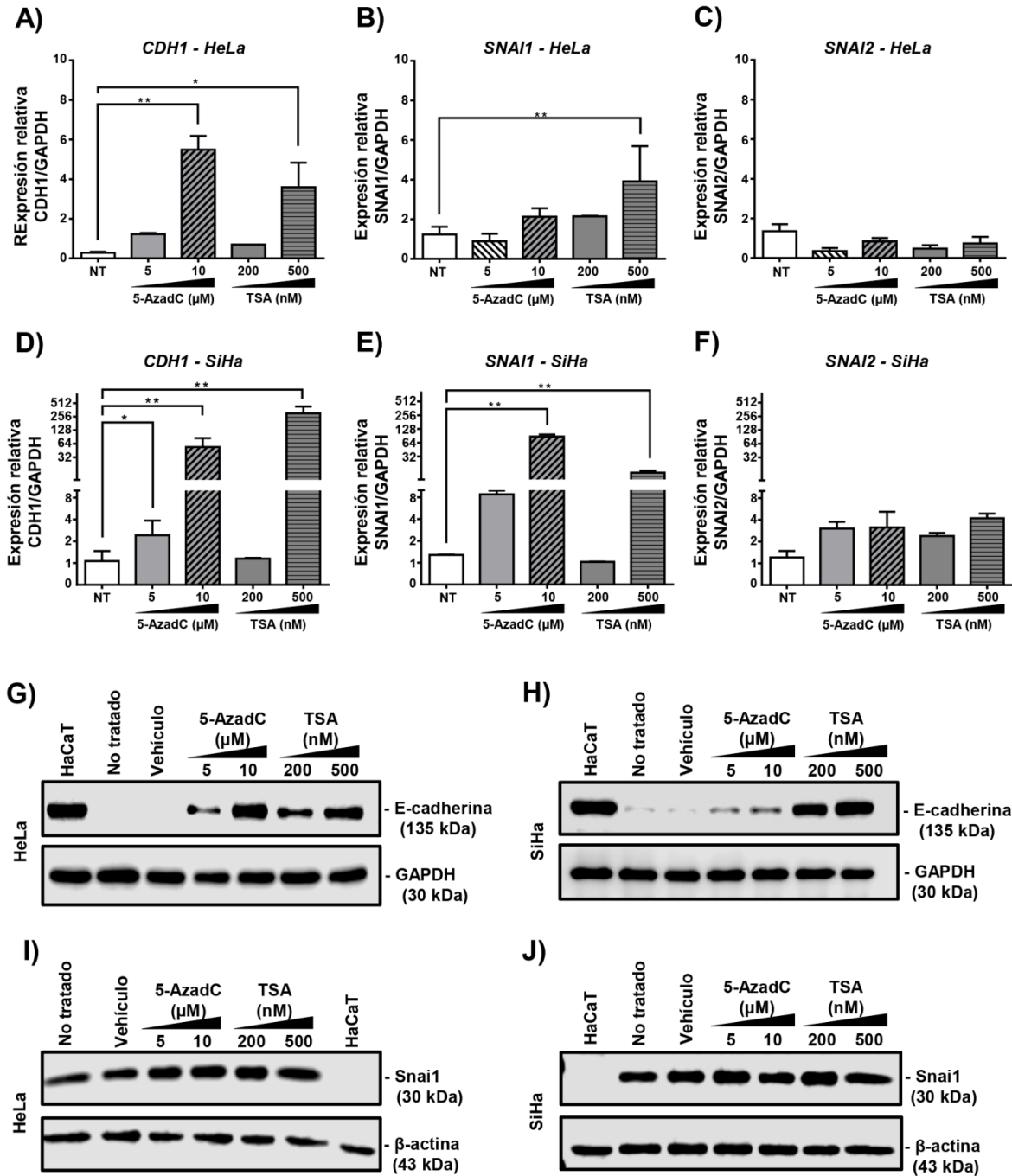


Figura 9. Cambios en los niveles de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en células HeLa y SiHa después del tratamiento con 5-AzadC y TSA. Graficas de qPCR que muestran los niveles de expresión de mRNA de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en (A-C) HeLa y (D-F) SiHa después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA en comparación con las células no tratadas (NT); *P<0.05, **P<0.01 frente a células no tratadas (NT). Expresión proteica de E-cadherina en las líneas celulares (G) HeLa y (H) SiHa. Expresión proteica de Snai1 en las líneas celulares (I) HeLa y (J) SiHa después de los tratamientos indicados.

IX. 5 La supresión de E7 por siRNA modifica los patrones de metilación del promotor de CDH1 e induce la expresión de CDH1 en líneas celulares HeLa y SiHa

Para examinar la participación de E7 en el patrón de metilación y en la expresión de *CDH1*, las líneas celulares HeLa y SiHa fueron transfectadas con siRNAs contra E7, lo que dio como resultado una reducción del 57.9% y 42.5% en el nivel de mRNA de E7, respectivamente (Fig. 10A y C). En la línea celular HeLa, la reducción de E7, condujo a la desmetilación de los sitios CpG del promotor de *CDH1* localizados entre las posiciones +9 a -45, así como en las posiciones -103 y -122 a -136 (Fig. 10A). Por otro lado, en la línea celular SiHa, se observó una desmetilación total en el promotor de *CDH1* después del silenciamiento de E7 (Fig. 10C). Por lo tanto, el silenciamiento parcial de E7 en las líneas celulares HeLa y SiHa produjo una disminución significativa en la metilación de la región promotora de *CDH1* en comparación con las células control no transfetadas ($P < 0.001$; Fig. 10B y D). Concomitantemente, se observaron niveles aumentados de mRNA y proteína de *CDH1* después del silenciamiento de E7 en HeLa (Fig. 11B y F) y SiHa (Figura 11B y G). El uso de Silencer[®] Select GAPDH siRNA como control positivo de siRNA excluyó la posibilidad de que los cambios en el patrón de metilación del promotor de *CDH1* pudieran deberse a las condiciones del transfección de los siRNA, sin embargo, se observó que el silenciamiento de GAPDH no indujo cambios significativos en el patrón de metilación del promotor de *CDH1* en las líneas celulares HeLa ($P = 0.7140$; Fig. 10B) y SiHa ($P = 0.3248$; Fig. 10D); por lo tanto, los cambios en el patrón de metilación de debieron al silenciamiento de E7.

IX. 6 La supresión de E7 por siRNA disminuye la expresión de SNAI1 y SNAI2 en las líneas celulares HeLa y en SiHa

Se identificó que el silenciamiento de E7 no solo induce la expresión de *CDH1*, sino que también disminuye significativamente la expresión de *SNAI1* y *SNAI2* ($P < 0.001$) en las líneas celulares HeLa y SiHa (Figs. 11D, E, H e I). Esto podría indicar que E7 no solo está involucrado en la supresión de la expresión de *CDH1*, sino que también regula la expresión de *SNAI1* y *SNAI2*, los cuales regulan negativamente a *CDH1*. No se observaron cambios significativos en la expresión de *E7*, *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA seguido del silenciamiento de *GAPDH* en las líneas celulares HeLa y SiHa ($P > 0.5$; Fig. 11A, B, D y E). Sin embargo, se observó que el silenciamiento de *GAPDH* dio como resultado una disminución de Snai1 a nivel de proteína en la línea celular HeLa (Fig. 11H).

Debido a que se utilizaron los housekeeping *GAPDH* y *HPRT* para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados, no se observaron diferencias significativas en la reducción de la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA (Fig. 11D). En este sentido, adicionalmente se determinó el nivel de expresión de los genes *GAPDH*, *CDH1* y *SNAI1*, los cuales fueron normalizados contra β -ACTINA, en donde se observó que *GAPDH* se expresa 2.6 veces más en HaCaT, 1.6 veces más en HeLa, 3.3 veces más en SiHa y 3.8 veces más en Ca Ski, comparados con una muestra comercial de cérvix normal (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) (Fig. 12).

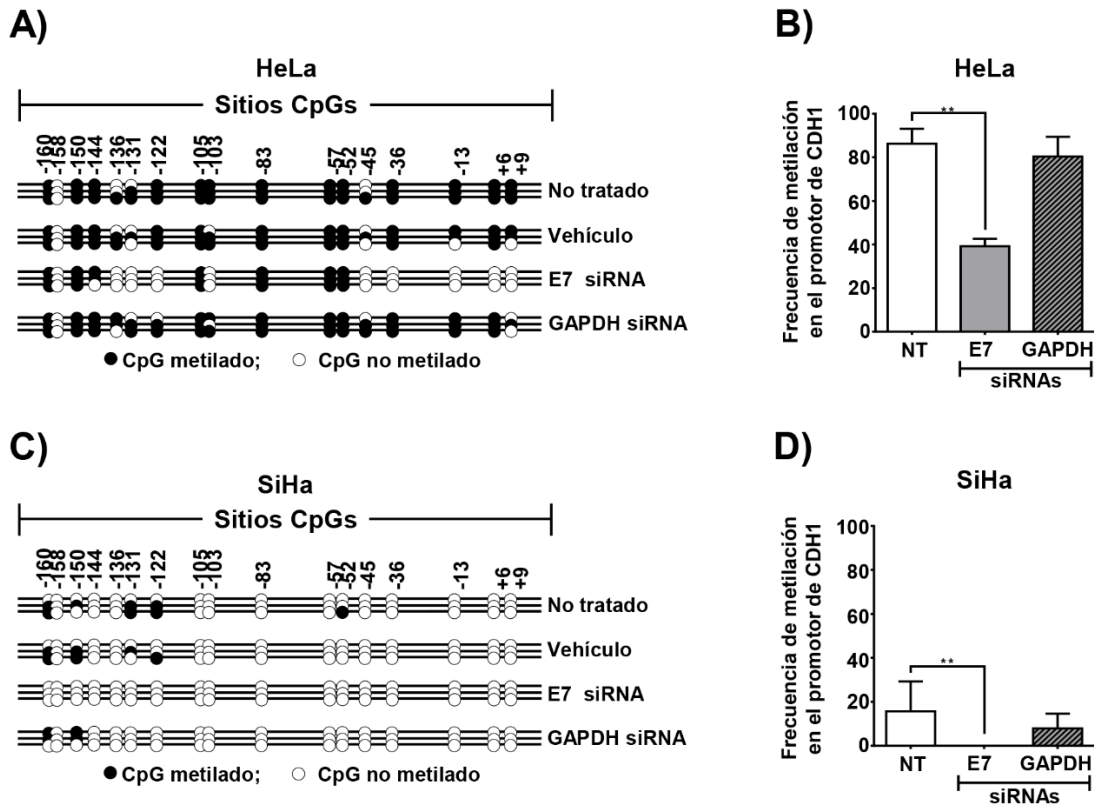


Figura 10. El silenciamiento de E7 de VPH tipo 16 y 18 modifica el patrón de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares HeLa y SiHa. Diagramas de metilación tipo lollipop muestran los cambios en el patrón de metilación en sitios CpG de la región promotora de *CDH1* en las líneas celulares (A) HeLa y (C) SiHa después de la transfección con siRNAs dirigidos contra E7 y GAPDH en comparación con células de control sin transfectar (NT) y control de vehículo. Un círculo negro (●) indica una CpG metilada y un círculo blanco (○) indica una CpG no metilada. Frecuencia de metilación del promotor de *CDH1* en células (B) HeLa y (D) SiHa después de la transfección con siRNA dirigido contra E7 de VPH18, E7 de VPH16 y GAPDH en comparación con células no transfectadas (NT).

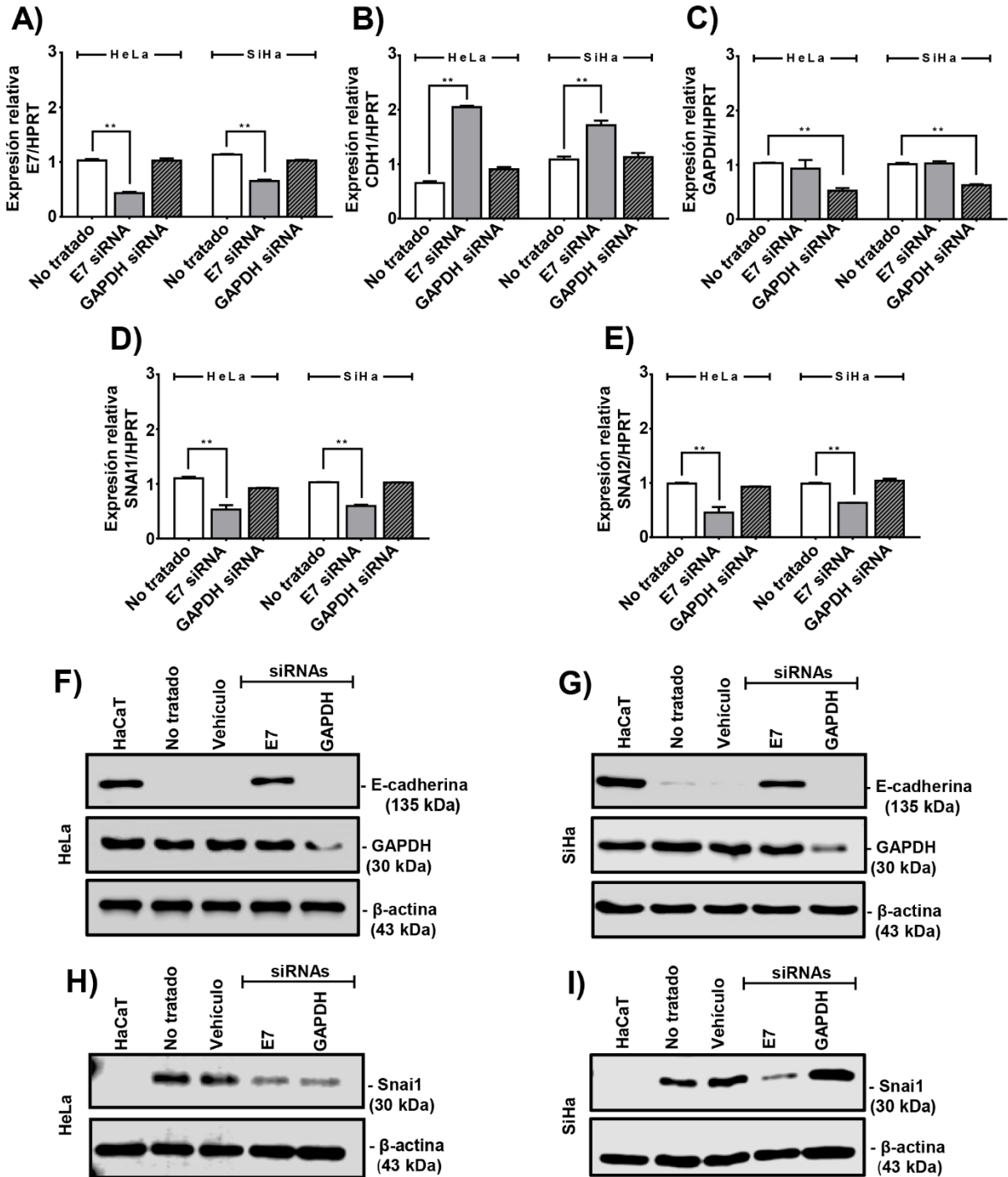


Figura 11. El silenciamiento de E7 de VPH tipo 18 y 16 modifica la expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en líneas celulares HeLa y SiHa. En (A-E) se muestran los niveles relativos de expresión de mRNA de *E7*, *CDH1*, *GAPDH*, *SNAI1* y *SNAI2* en líneas celulares HeLa y SiHa después de la transfección con siRNAs contra *E7* y *GAPDH*. *P < 0.05, **P < 0.01 frente a células no transfectadas (NT). Expresión proteica de E-cadherina, Snai1, GAPDH y beta-actina en las líneas celulares (F y H) HeLa y (G e I) SiHa después de la transfección con siRNAs dirigidos contra *E7* y *GAPDH*.

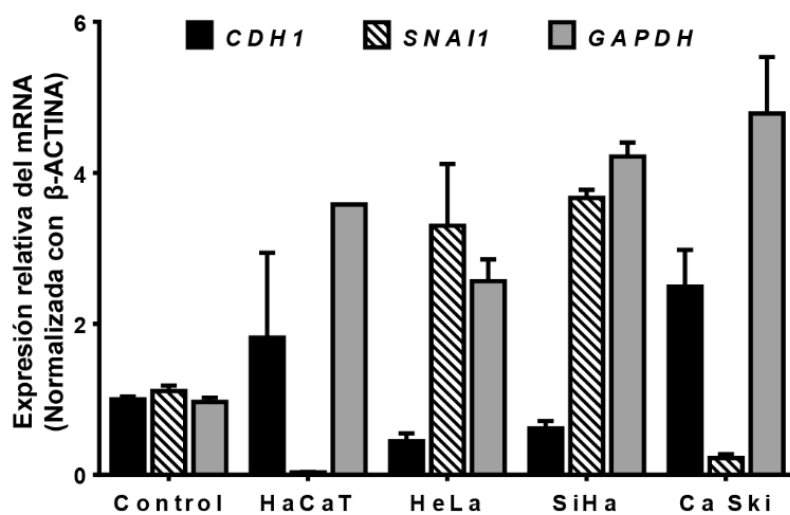


Figura 12. Diferencias en los niveles de expresión de los genes *CDH1*, *SNAI1*, *GAPDH* y β -*ACTINA* en las líneas celulares HaCaT, HeLa, SiHa y Ca Ski, evaluados mediante qPCR. Una muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) se utilizó como control de referencia para obtener los valores relativos. Los valores de Δ Ct de cada gen se normalizaron con el gen de referencia β -*ACTINA* utilizando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$).

X. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que el VPH-AR activa la maquinaria de metilación celular, que no solo metila a su propio genoma, sino que también las regiones promotoras de genes celulares [76]. En este contexto, Laurson et al., demostraron que E7 no solo induce la expresión de Dnmt1, sino que también suprime la expresión del gen *CDH1*, que codifica la E-cadherina [81]. Se ha reportado que la reducción de E-cadherina contribuye a la persistencia del VPH [81], concordando con otros estudios que indican que E7 interactúa e induce la expresión de Dnmt1, desencadenando su actividad de metilación *de novo* [72] (Fig. 13A). Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos reportados previamente por Laurson et al., en el que E7 de VPH16 suprimió la expresión de *CDH1* [81]. Sin embargo, en este estudio previo no se observaron diferencias significativas en el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* de las células NIKS que sobreexpresan E7, ya que los 17 sitios CpGs analizados no estaban metilados. Por otro lado, Laurson et al., mostró que el tratamiento con 5-AzadC restableció la expresión de *CDH1* a nivel de mRNA y proteínas [81]; sin embargo, la concentración de 5-AzadC utilizada no se estableció y los cambios en la expresión de otros genes celulares no se analizaron.

Además, en el presente estudio se evaluó la reexpresión de *CDH1* a nivel de mRNA y proteína en las líneas celulares HeLa (Fig. 9A y G) y SiHa (Fig. 9D y H) tratadas con 5-AzadC y TSA, así como los cambios en el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* (Fig. 8A y C). Adicionalmente, aunque TSA no es un agente desmetilante; nosotros observamos una desmetilación en el promotor de *CDH1* después del tratamiento con TSA. Este efecto concuerda con otros estudios que han reportado que la TSA no solo induce la acetilación de histonas al inhibir la actividad desacetilasa de histonas, sino que también, se asocia con un efecto desmetilante del DNA, esto probablemente, derivado de la modificación de las histonas, que podría conducir que un gen sea susceptible de desmetilación del DNA por la maquinaria de desmetilación [105, 106].

Por otro lado, se observó un aumento a nivel de mRNA en *SNAI1* después del tratamiento con TSA a 500 nM en células HeLa (Fig. 9B), mientras que en la línea celular SiHa se observó un incremento a nivel de mRNA en *SNAI1* después del tratamiento con 5-AzadC a 10 μ M y TSA a 500 nM (Fig. 9E); sin embargo, no se observaron cambios de *SNAI1* a nivel de proteína en ambas líneas celulares (Fig. 9I y J). Este resultado concuerda con otros estudios en los que tales tratamientos no solo restablecieron la expresión de *CDH1*, sino que también indujeron una sobreexpresión de *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA [105-

[108], lo que probablemente se deba a modificaciones en el patrón de metilación en regiones promotoras de *SNAI1* y *SNAI2* [109]. En este contexto, el papel de la regulación del gen de *SNAI1* por los mecanismos epigenéticos es en gran parte desconocido. Un estudio previo mostró que el tratamiento con 5-AzadC en células de fibroblastos IMR90, células madre pluripotentes inducidas (iPSC) de IMR90, BeWo y HTR8/SVneo indujo una mayor expresión de *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA y que la regulación de ambos genes está mediada por metilación del DNA del primer intrón y no por la metilación del DNA de su región promotora; sin embargo, este estudio previo no determinó la expresión de estos genes a nivel de proteína [109]. En este sentido, en el presente estudio, no determinamos el estado de metilación de la región promotora de *SNAI1* debido a que dicho gen es transcripcionalmente activo tanto en las células HeLa como en las células SiHa (Fig. 7A y B). Las diferencias observadas en el efecto sobre la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA y proteína por los tratamientos con 5-AzadC y TSA indican que probablemente hay otros factores que regulan la expresión de *SNAI1* a nivel de proteína en ambas líneas celulares.

Por otro lado, los resultados publicados por Laurson et al., sugirieron que en el modelo de células NIKS, la supresión de la expresión de *CDH1* por E7 era independiente del estado de metilación de la región promotora de *CDH1* [81], como se observó en la línea celular SiHa en el presente estudio (Figs. 5B y C; 7A y B; 8C-D y 9D). El estudio anterior también sugirió que la represión de *CDH1* podría regularse a través de *SNAI2* (*SLUG*); sin embargo, reportaron que la expresión de *SNAI2* no fue alterada por la presencia de E7 [81]. Los resultados actuales, revelaron que *SNAI1* está expresado a nivel de mRNA y proteína en las líneas células HeLa y SiHa (Fig. 7A y B); por otro lado, la expresión de *SNAI2* fue apenas detectable en las líneas celulares HaCaT y Ca Ski a nivel de mRNA (Fig. 7A y B). En este sentido, se ha demostrado que *SNAI2* está regulado positivamente en los queratinocitos (células HaCaT) solo durante el proceso de motilidad celular y curación de heridas [110].

Adicionalmente, se identificó que luego de silenciar a E7 de VPH16 y VPH18, la expresión de *CDH1* fue reestablecida en las células HeLa y SiHa, lo que concuerda con un estudio previo de Caberg et al [80]. En dicho estudio se reportó que después de 24 h de transfección con siRNA contra E7 de VPH16 en células SiHa, *CDH1* se volvió a expresar y se detectó un aumento de la proteína de retinoblastoma (pRb) y la proteína activadora 2 α (AP2 α), en donde pRb es el principal responsable del check point en la fase G1, bloqueando la entrada a la fase S y el crecimiento celular, no se detectaron cambios en los niveles de expresión de mRNA de *SNAI1* y *SNAI2* [80]. Por otro lado, el presente estudio demostró que

después de 48 h de transfección con siRNA contra E7 de VPH16 y VPH18, se observaron cambios en el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* tanto en HeLa (Fig. 10A y B) como en SiHa (Fig. 10C y D). Además, se identificó un aumento en los niveles de expresión de *CDH1* tanto a nivel de mRNA (Fig. 11B) y de proteína (Fig. 11F y G), así como una disminución de *SNAI1* y *SNAI2* a nivel de mRNA (Fig. 11D-E) y proteína (Fig. 11H e I). Por lo tanto, los resultados actuales sugieren que E7 no solo suprime la expresión de *CDH1* a través de la metilación de su promotor, sino que también regula positivamente la expresión de *SNAI1*, un regulador negativo de *CDH1* involucrado en la TEM y asociado con metástasis [89, 102-104]. Esto resultados concuerdan también con el mecanismo de acción reportado para otros virus oncogénicos, en donde la proteína X del VHB (HBx), la proteína core del VHC y la proteína de la membrana latente 1 (LMP1) del VEB promueve la TEM y la metástasis al inducir la expresión de *SNAI1* y la supresión de la expresión de *CDH1* [111-114].

Además, en el presente estudio se observó que después de silenciar *GAPDH* con siRNA, la expresión de *SNAI1* fue parcialmente suprimida en células HeLa a nivel de proteína (Fig. 11H) pero no a nivel de mRNA (Fig. 11D). Esto es consistente con un estudio previo que demostró que la interacción de GAPDH con Sp1 da como resultado un aumento de la expresión de Snai1, que promueve la proliferación y metástasis de las células cancerosas, y que la supresión de GAPDH con shRNA dio como resultado una disminución significativa de Snai1 en las líneas celulares HCT116 y LoVo [115]. Lo que sugiere que *GAPDH* podría desempeñar un papel durante el proceso metastásico del adenocarcinoma de cuello uterino (HeLa) al afectar la TEM a través de la regulación positiva de la expresión de Snai1 mediada por Sp1, similar a la función reportada en el cáncer de colon [115], pero se requieren estudios adicionales para aclarar este punto.

Por otro lado, actualmente se desconoce cómo el VPH podría activar la expresión de *SNAI1*; sin embargo, se ha reportado en otros tipos de cánceres asociados a virus que las proteínas HBx, core y LMP1 aumentan la expresión de *SNAI1* a través de la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK por acción de TGF- β [111, 116-119], que concuerda con un estudio previo de Peinado et al., en el que se reportó que TGF- β induce la transcripción *SNAI1* en donde las vías MAPK y PI3K están implicadas [120].

En el presente estudio, no determinamos qué vías de señalización podrían participar en la regulación de la expresión de *SNAI1*; sin embargo, estudios previos han reportado que la infección por VPH-AR activa la vía PI3K/Akt/mTOR [21], en el que E7 del VPH regula

positivamente la actividad de Akt a través de la proteína pRb [121] y que TGF- β estimula la TEM y la invasión tumoral en células SiHa [122].

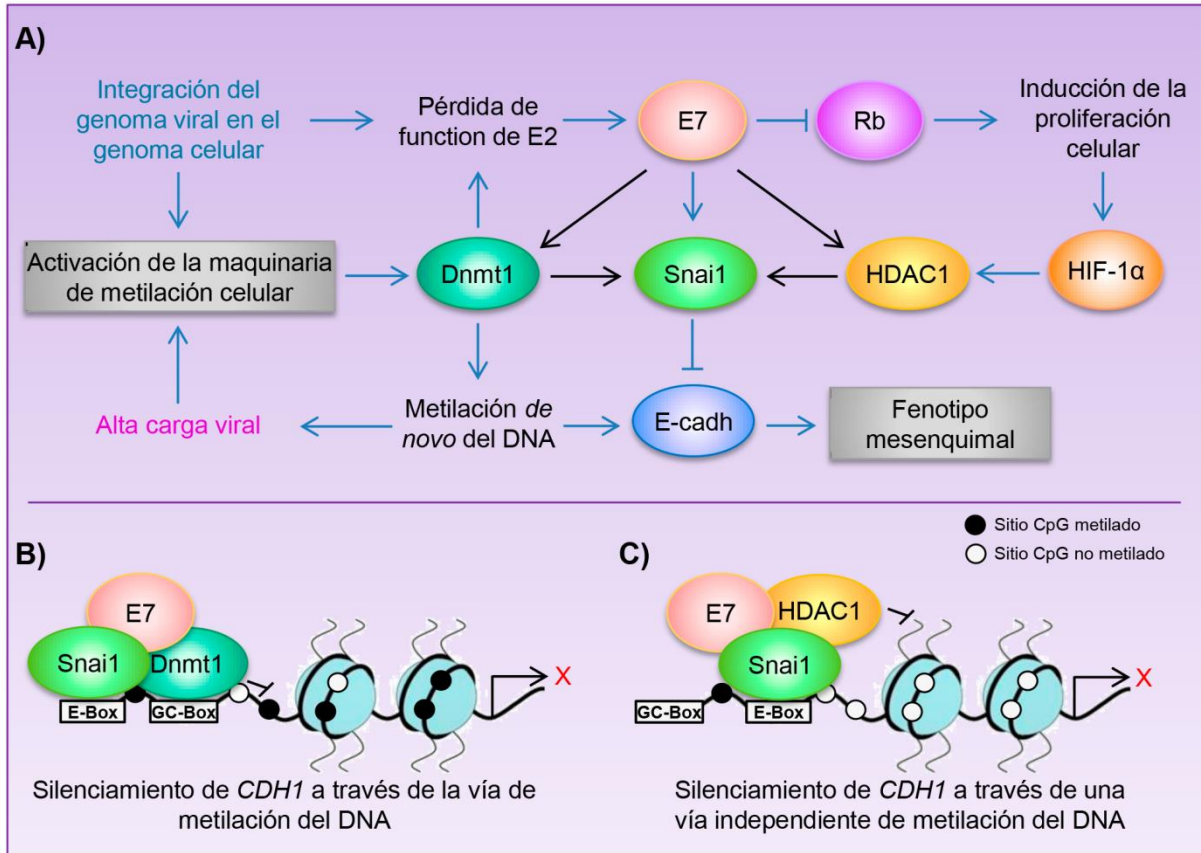


Figura 13. Modelo esquemático que demuestra cómo E7 de VPH-AR puede inducir la TEM a través de Snai1. (A) Esquematiza a proteínas que interactúan con E7 o cuya expresión es inducida por E7. La pérdida de la función de E2, ya sea por el fenómeno de integración o por la metilación de los sitios de unión a E2 en la región larga de control (LCR) del VPH, da a lugar a la expresión desregulada de las oncoproteínas E6 y E7. La oncoproteína E7 desempeña un papel importante en la regulación de varias vías; E7 induce la proliferación celular a través de pRb. Además, E7 no solo induce la expresión de Dnmt1 y HDAC1, sino que también interactúa físicamente con ellos, lo que promueve la regulación epigenética de sus propios genes virales y de genes celulares. Los hallazgos presentados en este estudio indican que E7 no solo suprime la expresión de *CDH1* a través de la metilación de su región promotora, sino que también induce la expresión de Snai1, que es un regulador negativo de la expresión de *CDH1*. En (B y C) se ilustran modelos propuestos de cómo E7 podría regular la expresión de *CDH1*. VPH, Virus de Papiloma Humano; *CDH1*, cadherina 1; Dnmt1, ADN metiltransferasa 1; HDAC1, desacetilasa de histona tipo 1; HIF-1 α , factor 1 α inducible por hipoxia; pRb, proteína del retinoblastoma.

XI. CONCLUSIÓN

Los resultados actuales indican que E7 de VPH-AR puede regular la expresión de *CDH1* por dos vías diferentes en las que *Snai1* está involucrado. La primera vía implica la hipermetilación de la región promotora de *CDH1* y la expresión de *Snai1*, como se observa en la línea celular HeLa (Fig. 13B). La segunda vía implica la hipometilación de la región promotora de *CDH1* con la expresión de *Snai1* como se observa en la línea celular SiHa (Fig. 13C), sugiriendo así que *CDH1* y *SNAI1* podrían considerarse como biomarcadores de metástasis en el cáncer de cuello uterino.

XII. FUTUROS ALCANCES

En este sentido, los datos obtenidos en el presente estudio permitieron el ingreso ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) de la solicitud de patente con número de expediente **MX/a/2019/014593**, que en resumen reclama:

1. Un método y un kit para identificar que un tumor asociado a VPH presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal, en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer procedente de un sujeto.
2. Un inhibidor de DNA metiltransferasas para usarse en el tratamiento de un tumor que previamente ha sido identificado como que presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal.
3. Un inhibidor de desacetilasas de histonas para usarse en el tratamiento de un tumor que previamente ha sido identificado como que presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal.
4. Un siRNA dirigido contra E7 de VPH-AR para usarse en el tratamiento de un tumor que previamente ha sido identificado como que presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal.

Por otro lado y basados en nuestros resultados y en la evidencia previa de que E7 interactúa con Dnmt1 y HDAC1 [67, 71, 72], sería conveniente para futuros ensayos determinar si E7 de VPH-AR es capaz de interactuar con *Snai1* para formar un complejo co-represor ya sea con Dnmt1 o con HDAC1 en el promotor de *CDH1*, que pudiera explicar el fenómeno de la supresión de la expresión de *CDH1* durante el proceso de TEM e identificar nuevos candidatos terapéuticos.

XIII. REFERENCIAS

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. 136(5): p. E359-86.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. 384(2): p. 260-5.
4. Bansal, A., M.P. Singh, and B. Rai, *Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem*. Int J Appl Basic Med Res, 2016. 6(2): p. 84-9.
5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
6. Doorbar, J., *Latent papillomavirus infections and their regulation*. Curr Opin Virol, 2013. 3(4): p. 416-21.
7. Schiffman, M., et al., *Carcinogenic human papillomavirus infection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. 2: p. 16086.
8. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. 324(1): p. 17-27.
9. Munoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. N Engl J Med, 2003. 348(6): p. 518-27.
10. Weinberger, P.M., et al., *Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis*. J Clin Oncol, 2006. 24(5): p. 736-47.
11. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. 189(1): p. 12-9.
12. Andersson, S., et al., *Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN)*. Br J Cancer, 2005. 92(12): p. 2195-200.
13. Moberg, M., et al., *High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma*. Br J Cancer, 2005. 92(5): p. 891-4.
14. Snijders, P.J., et al., *Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology*. Int J Cancer, 2006. 119(5): p. 1102-7.
15. Swan, D.C., et al., *Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type*. J Clin Microbiol, 1999. 37(4): p. 1030-4.

16. Crum, C.P., *Contemporary theories of cervical carcinogenesis: the virus, the host, and the stem cell*. Mod Pathol, 2000. 13(3): p. 243-51.
17. Lopez, J., et al., *Human papillomavirus infections and cancer stem cells of tumors from the uterine cervix*. Open Virol J, 2012. 6: p. 232-40.
18. Schneider, J., et al., *Human Uterine Cervical Stromal Stem Cells (hUCESCs): Why and How they Exert their Antitumor Activity*. Cancer Genomics Proteomics, 2016. 13(5): p. 331-7.
19. Abban, C.Y. and P.I. Meneses, *Usage of heparan sulfate, integrins, and FAK in HPV16 infection*. Virology, 2010. 403(1): p. 1-16.
20. Surviladze, Z., A. Dziduszko, and M.A. Ozbun, *Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections*. PLoS Pathog, 2012. 8(2): p. e1002519.
21. Surviladze, Z., et al., *Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy*. J Virol, 2013. 87(5): p. 2508-17.
22. Wright, A.A., et al., *Oncogenic mutations in cervical cancer: genomic differences between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the cervix*. Cancer, 2013. 119(21): p. 3776-83.
23. Daniel, B., et al., *Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR*. J Gen Virol, 1995. 76 (Pt 10): p. 2589-93.
24. Durst, M., et al., *The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours*. J Gen Virol, 1985. 66 (Pt 7): p. 1515-22.
25. Lehn, H., et al., *Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract*. J Gen Virol, 1988. 69 (Pt 1): p. 187-96.
26. Badal, S., et al., *The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation*. Virology, 2004. 324(2): p. 483-92.
27. Badal, V., et al., *CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression*. J Virol, 2003. 77(11): p. 6227-34.
28. Fernandez, A.F., et al., *The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer*. Genome Res, 2009. 19(3): p. 438-51.
29. Kalantari, M., et al., *Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia*. J Virol, 2004. 78(23): p. 12762-72.

30. Kalantari, M., et al., *Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines*. *Virology*, 2008. 374(2): p. 292-303.
31. Rosl, F., et al., *The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses*. *J Gen Virol*, 1993. 74 (Pt 5): p. 791-801.
32. Arias-Pulido, H., et al., *Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 2006. 44(5): p. 1755-62.
33. Cricca, M., et al., *Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions*. *J Virol Methods*, 2009. 158(1-2): p. 180-3.
34. Bhattacharjee, B. and S. Sengupta, *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(2): p. 280-5.
35. Jacquin, E., et al., *Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR*. *J Clin Microbiol*, 2013. 51(10): p. 3207-15.
36. Jeon, S. and P.F. Lambert, *Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(5): p. 1654-8.
37. Munger, K., et al., *The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes*. *J Virol*, 1989. 63(10): p. 4417-21.
38. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18*. *Embo J*, 1991. 10(13): p. 4129-35.
39. Huibregtse, J.M., M. Scheffner, and P.M. Howley, *Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins*. *Mol Cell Biol*, 1993. 13(8): p. 4918-27.
40. Scheffner, M., et al., *The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53*. *Cell*, 1993. 75(3): p. 495-505.
41. Kumar, A., et al., *Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(16): p. 5801-12.

42. Shamanin, V.A., P. Sekaric, and E.J. Androphy, *hAda3 degradation by papillomavirus type 16 E6 correlates with abrogation of the p14ARF-p53 pathway and efficient immortalization of human mammary epithelial cells*. J Virol, 2008. 82(8): p. 3912-20.
43. Munger, K., et al., *Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product*. EMBO J, 1989. 8(13): p. 4099-105.
44. Dyson, N., et al., *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product*. Science, 1989. 243(4893): p. 934-7.
45. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 1996. 56(20): p. 4620-4.
46. Pappa, K.I., et al., *Novel structural approaches concerning HPV proteins: Insight into targeted therapies for cervical cancer (Review)*. Oncol Rep, 2018. 39(4): p. 1547-1554.
47. Smotkin, D. and F.O. Wettstein, *The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein*. J Virol, 1987. 61(5): p. 1686-9.
48. Phelps, W.C., et al., *The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A*. Cell, 1988. 53(4): p. 539-47.
49. Roman, A. and K. Munger, *The papillomavirus E7 proteins*. Virology, 2013. 445(1-2): p. 138-68.
50. Berk, A.J., *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. Oncogene, 2005. 24(52): p. 7673-85.
51. Helt, A.M. and D.A. Galloway, *Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes*. J Virol, 2001. 75(15): p. 6737-47.
52. Huh, K., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor*. J Virol, 2007. 81(18): p. 9737-47.
53. Munger, K., et al., *Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis*. J Virol, 2004. 78(21): p. 11451-60.
54. Barbosa, M.S., et al., *The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation*. EMBO J, 1990. 9(1): p. 153-60.
55. Firzloff, J.M., et al., *The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II*. New Biol, 1989. 1(1): p. 44-53.

56. Massimi, P. and L. Banks, *Differential phosphorylation of the HPV-16 E7 oncoprotein during the cell cycle*. Virology, 2000. 276(2): p. 388-94.
57. Dick, F.A. and N.J. Dyson, *Three regions of the pRB pocket domain affect its inactivation by human papillomavirus E7 proteins*. J Virol, 2002. 76(12): p. 6224-34.
58. Songcock, W.K., S.M. Kim, and J.M. Bodily, *The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription*. Virus Res, 2017. 231: p. 56-75.
59. Munger, K., et al., *Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein*. Oncogene, 2001. 20(54): p. 7888-98.
60. Zhou, Y., et al., *Role of WDHD1 in Human Papillomavirus-Mediated Oncogenesis Identified by Transcriptional Profiling of E7-Expressing Cells*. J Virol, 2016. 90(13): p. 6071-6084.
61. Johung, K., E.C. Goodwin, and D. DiMaio, *Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence*. J Virol, 2007. 81(5): p. 2102-16.
62. Garner-Hamrick, P.A., et al., *Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system*. J Virol, 2004. 78(17): p. 9041-50.
63. Nees, M., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes*. Cancer Res, 2000. 60(15): p. 4289-98.
64. Gyongyosi, E., et al., *Transcriptional regulation of genes involved in keratinocyte differentiation by human papillomavirus 16 oncoproteins*. Arch Virol, 2015. 160(2): p. 389-98.
65. Nees, M., et al., *Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes*. J Virol, 2001. 75(9): p. 4283-96.
66. Cortes-Malagon, E.M., et al., *Gene expression profile regulated by the HPV16 E7 oncoprotein and estradiol in cervical tissue*. Virology, 2013. 447(1-2): p. 155-65.
67. Brehm, A., et al., *The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth*. EMBO J, 1999. 18(9): p. 2449-58.
68. Jansma, A.L., et al., *The high-risk HPV16 E7 oncoprotein mediates interaction between the transcriptional coactivator CBP and the retinoblastoma protein pRb*. J Mol Biol, 2014. 426(24): p. 4030-4048.

69. Fera, D. and R. Marmorstein, *Different regions of the HPV-E7 and Ad-E1A viral oncoproteins bind competitively but through distinct mechanisms to the CH1 transactivation domain of p300*. *Biochemistry*, 2012. 51(47): p. 9524-34.
70. Bernat, A., et al., *Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300*. *Oncogene*, 2003. 22(39): p. 7871-81.
71. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31*. *J Virol*, 2004. 78(7): p. 3533-41.
72. Burgers, W.A., et al., *Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases*. *Oncogene*, 2007. 26(11): p. 1650-5.
73. Zhang, Y., et al., *The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities*. *Cell*, 1998. 95(2): p. 279-89.
74. Li, H., et al., *HPV16E7 mediates HADC chromatin repression and downregulation of MHC class I genes in HPV16 tumorigenic cells through interaction with an MHC class I promoter*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(4): p. 1315-21.
75. Georgopoulos, N.T., J.L. Proffitt, and G.E. Blair, *Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins*. *Oncogene*, 2000. 19(42): p. 4930-5.
76. Milutin Gasperov, N., et al., *Methylated Host Cell Gene Promoters and Human Papillomavirus Type 16 and 18 Predicting Cervical Lesions and Cancer*. *PLoS One*, 2015. 10(6): p. e0129452.
77. Liu, J., et al., *Downregulation of E-cadherin by hepatitis B virus X antigen in hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2006. 25(7): p. 1008-17.
78. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *Viruses associated with human cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1782(3): p. 127-50.
79. Tsai, C.N., et al., *The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(15): p. 10084-9.
80. Caberg, J.H., et al., *Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes*. *Carcinogenesis*, 2008. 29(7): p. 1441-7.

81. Laurson, J., et al., *Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein*. Carcinogenesis, 2010. 31(5): p. 918-26.
82. Diao, M.K., et al., *Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines*. Life Sci, 2015. 127: p. 46-52.
83. Friedl, F., et al., *Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology*. Proc Soc Exp Biol Med, 1970. 135(2): p. 543-5.
84. Pater, M.M. and A. Pater, *Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix*. Virology, 1985. 145(2): p. 313-8.
85. Pater, M.M. and A. Pater, *Expression of human papillomavirus types 16 and 18 DNA sequences in cervical carcinoma cell lines*. J Med Virol, 1988. 26(2): p. 185-95.
86. Pattillo, R.A., et al., *Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line*. Science, 1977. 196(4297): p. 1456-8.
87. Schneider-Gadicke, A. and E. Schwarz, *Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes*. EMBO J, 1986. 5(9): p. 2285-92.
88. Yee, C., et al., *Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines*. Am J Pathol, 1985. 119(3): p. 361-6.
89. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. 2(2): p. 76-83.
90. Meissner, J.D., *Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines*. J Gen Virol, 1999. 80 (Pt 7): p. 1725-33.
91. Spence, R.P., et al., *Analysis of human papillomavirus sequences in cell lines recently derived from cervical cancers*. Cancer Res, 1988. 48(2): p. 324-8.
92. De la Cruz-Hernandez, E., et al., *Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences*. J Gen Virol, 2005. 86(Pt 9): p. 2459-68.
93. Vazquez-Vega, S., et al., *[RNA interference (RNAi) and its therapeutic potential in cancer]*. Rev Invest Clin, 2010. 62(1): p. 81-90.
94. Vazquez-Vega, S., et al., *Regulation of p14ARF expression by HPV-18 E6 variants*. J Med Virol, 2013. 85(7): p. 1215-21.
95. Gutierrez, J., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein upregulates the retinoic acid receptor-beta expression in cervical cancer cell lines and K14E7 transgenic mice*. Mol Cell Biochem, 2015. 408(1-2): p. 261-72.

96. Momparler, R.L., *Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)*. Semin Oncol, 2005. 32(5): p. 443-51.
97. Vigushin, D.M., et al., *Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo*. Clin Cancer Res, 2001. 7(4): p. 971-6.
98. Jiang, M. and J. Milner, *Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference*. Oncogene, 2002. 21(39): p. 6041-8.
99. Lea, J.S., et al., *Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells*. Reprod Sci, 2007. 14(1): p. 20-8.
100. Hoffmann, I., Hilger, M. and Mueller, O., *Homo sapiens promoter of E-cadherin from HEK293 cells*; URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/84626357>. Max-Planck-Institut fuer Molekulare Physiologie, 2006.
101. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
102. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9543-56.
103. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. 7(6): p. 415-28.
104. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. 48(5-6): p. 365-75.
105. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet, 1999. 21(1): p. 103-7.
106. Ou, J.N., et al., *Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines*. Biochem Pharmacol, 2007. 73(9): p. 1297-307.
107. Liu, Y.N., et al., *Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression*. Oncogene, 2005. 24(56): p. 8277-90.
108. Meng, F., et al., *Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer*. Br J Cancer, 2013. 108(3): p. 579-86.
109. Chen, Y., et al., *DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 1083-90.

110. Savagner, P., et al., *Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes*. J Cell Physiol, 2005. 202(3): p. 858-66.
111. Arzumanyan, A., et al., *Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer*. Oncogene, 2012. 31(5): p. 563-72.
112. Horikawa, T., et al., *Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma*. Br J Cancer, 2011. 104(7): p. 1160-7.
113. Liu, H., et al., *Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein*. Cancer Sci, 2012. 103(12): p. 2072-81.
114. Nie, D., et al., *Hepatitis C virus core protein interacts with Snail and histone deacetylases to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2016. 35(28): p. 3626-35.
115. Liu, K., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAIL expression*. Int J Oncol, 2017. 50(1): p. 252-262.
116. Liu, Y., et al., *Hepatitis B virus X protein amplifies TGF-beta promotion on HCC motility through down-regulating PPM1a*. Oncotarget, 2016. 7(22): p. 33125-35.
117. Park, G.B., et al., *The Epstein-Barr virus causes epithelial-mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via Syk/src and Akt/Erk signaling pathways*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. 55(3): p. 1770-9.
118. Sides, M.D., et al., *The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor--beta1 synergistically induce epithelial--mesenchymal transition in lung epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. 44(6): p. 852-62.
119. Taniguchi, H., et al., *Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription*. J Med Virol, 2004. 72(1): p. 52-9.
120. Peinado, H., M. Quintanilla, and A. Cano, *Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions*. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 21113-23.
121. Menges, C.W., et al., *Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein*. Cancer Res, 2006. 66(11): p. 5555-9.
122. Yi, J.Y., et al., *TGFbeta1 -mediated epithelial to mesenchymal transition is accompanied by invasion in the SiHa cell line*. Eur J Cell Biol, 2002. 81(8): p. 457-68.

XIV. ANEXO I - Artículo Científico: Rosendo-Chalma P, et al. International Journal of Oncology. 2020.

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 57: 301-313, 2020

CDH1 and SNAI1 are regulated by E7 from human papillomavirus types 16 and 18

PEDRO ROSENDO-CHALMA^{1,2}, VERÓNICA ANTONIO-VEJAR^{2,3}, GABRIELE DAVIDE BIGONI-ORDÓÑEZ², CARLOS CÉSAR PATIÑO-MORALES², AMPARO CANO-GARCÍA^{4,5} and ALEJANDRO GARCÍA-CARRANCA²

¹Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 10450; ²Laboratorio de Virus y Cáncer, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer of Instituto de Investigaciones Biomédicas-Universidad Nacional Autónoma de México (IIB-UNAM) and División de Investigación Básica of Instituto Nacional de Cancerología-Secretaría de Salud (INCan-SSA), Mexico City 14080; ³Laboratorio de Biomedicina Molecular, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas (UACQB), Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro), Chilpancingo, Guerrero 39090, Mexico; ⁴Departamento de Bioquímica, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' (CSIC-UAM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ); ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid 28029, Spain

Received January 11, 2019; Accepted October 24, 2019

DOI: 10.3892/ijo.2020.5039

Abstract. A common characteristic of cancer types associated with viruses is the dysregulated expression of the *CDH1* gene, which encodes E-cadherin, in general by activation of DNA methyltransferases (Dnmts). In cervical cancer, E7 protein from high risk human papillomaviruses (HPVs) has been demonstrated to interact with Dnmt1 and histone deacetylase type 1 (HDAC1). The present study proposed that E7 may regulate the expression of *CDH1* through two pathways: i) Epigenetic, including DNA methylation; and ii) Epigenetic-independent, including the induction of negative regulators of *CDH1* expression, such as Snail family transcriptional repressor Snail1 and Snai2. To test this hypothesis, HPV16- and HPV18-positive cell lines were used to determine the methylation pattern of the *CDH1* promoter and its expression in association with its negative regulators. Different methylation frequencies were identified in the *CDH1* promoter in HeLa (88.24%) compared with SiHa (17.65%) and Ca Ski (0%) cell lines. Significant differences in the expression of *SNAI1* were observed between these cell lines, and an inverse association was identified between the expression levels of *SNAI1* and *CDH1*. In addition, suppressing E7 not only increased the expression of *CDH1*, but notably decreased the

expression of *SNAI1* and modified the methylation pattern of the *CDH1* promoter. These results suggested that the expression of *CDH1* was dependent on the expression of *SNAI1* and was inversely associated with the expression of E7. The present results indicated that E7 from HPV16/18 regulated the expression of *CDH1* by the two following pathways in which Snail is involved: i) Hypermethylation of the *CDH1* promoter region and increasing expression of *SNAI1*, as observed in HeLa; and ii) Hypomethylation of the *CDH1* promoter region and expression of *SNAI1*, as observed in SiHa. Therefore, the suppression of *CDH1* and expression of *SNAI1* may be considered to be biomarkers of metastasis in uterine cervical cancer.

Introduction

According to current research, 15-20% of all cases of cancer can be attributed to infectious agents, including *Helicobacter pylori* and human papillomavirus (HPV), followed by hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) and the Epstein-Barr virus (EBV) (1-3). In HPV, specifically types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 and 59 that are commonly referred to as high-risk (HR), are not only associated with cervical cancer (CC), the third most prevalent type of cancer worldwide in women in 2017, but also with other tumor types, including anal, penile, vulvar, vaginal and head and neck cancer (1,4).

Persistent infections with HR-HPVs are necessary, but not sufficient to cause cancer, indicating the existence of multistep actions in viral carcinogenesis that contribute to the characteristic hallmarks underlying the phenotype of tumors (3,5). Thus, it has been of great interest to study mechanisms by which persistent infections with these viruses contribute to cancer development. HPV has been demonstrated to induce a series of mechanisms that contribute to the evasion of the immune response and apoptosis-activated cell death, and finally the transformation, proliferation and cellular immortalization of the host cell (6,7).

Correspondence to: Dr Alejandro García-Carranca, Virus and Cancer Laboratory, Biomedical Research Unit on Cancer, National Cancer Institute, Ministry of Health, 22 San Fernando Avenue, Section XVI, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico
E-mail: carranca@biomedicas.unam.mx

Key words: epigenetic, human papillomavirus, E7, SNAI1, SNAI1/SNAI1, SNAI2, SLUG/SNAI2, CDH1, E-cadherin

HPV life cycle disruption due to integration of the viral genome into the cellular genome (8,9) and activation of the cell methylation machinery have been demonstrated to be involved in the carcinogenic process of CC among other factors (10-12). Specifically, the HR-HPV E7 oncoprotein has been reported to serve a crucial role in oncogenic transformation due to its ability to form complexes with members of the retinoblastoma protein (pRB) family and destabilize them (13,14), in addition to the ability to interact with other proteins, including histone deacetylase 1 (HDAC1) (15) and DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) (16).

E7 binds to HDAC1 via its zinc finger-like motif through an intermediary protein Mi2 β , which is a component of the nucleosome remodeling and histone deacetylation (NURD) complex that has the ability to modify chromatin structure through both deacetylation of histones and ATP-dependent nucleosome repositioning (17,18). The formation of this complex is necessary for the maintenance of viral episomes, controlling cell proliferation and extending cell life (15,17). Consistent with this, a chromatin immunoprecipitation assay in Ca Ski cells demonstrated that E7 and HDACs are associated with the major histocompatibility complex (MHC) class I promoter and histone deacetylation (19), as well as chromatin repression and the downregulation of MHC class I genes and MHC class I heavy chain, and repression of the genes encoding the transporter associated with antigen processing subunit 1 (TAP1) and low molecular weight protein 2 (LMP2) (20). Furthermore, an association with Dnmt1 is directed and mediated by the conserved region 3 (CR3) zinc-finger region of E7, which is known to contribute to E7 transformation functions and stimulate the methyltransferase activity of Dnmt1, which may lead to aberrant genome methylation and cellular transformation as a consequence of the silencing of tumor-suppressor genes (16). Another study has demonstrated that in samples of normal cervix and cervical cancer, HPV types 16 and 18 activate the cell methylation machinery to methylate viral DNA, as well as the promoter regions of cellular genes, including cyclin A1, Rubicon-like autophagy enhancer, retinoic acid receptor β 2, cadherin 1 (*CDH1*), death-associated protein kinase 1, human telomerase reverse transcriptase 1 (*hTERT1*), *hTERT2*, hypermethylated in cancer 1 and Twist Family BHLH Transcription Factor 1 (21). Therefore, previous evidence suggests that HR-HPV E7 serves an important role in the activation of the cellular methylation machinery, which regulates the transcription of viral and cellular genes either during their productive infection during its life cycle or during the carcinogenic process.

The mechanisms by which E7 is involved in the regulation of gene expression at the chromatin level are not well understood. It has been observed that a common characteristic of several cancer types associated with viruses is the decreased expression of *CDH1*, which encodes E-cadherin, through epigenetic mechanisms (22-24). In the case of cancer types associated with HPV infections, it has been demonstrated that HPV16 E7 suppresses the transcription of *CDH1*, which reduces protein expression of E-cadherin (25,26). In addition, HPV16 E7 has been reported to increase the amount and activity of Dnmt1 in NIKS cells, which are derived from foreskin keratinocytes transfected with HPV16 E7 or NIKS bearing episomal HPV16 DNA (26); however, NIKS cells not infected with HPV16

and NIKS bearing episomal HPV16 DNA did not exhibit any differences in the CpG methylation status of the *CDH1* promoter regions, as all CpG sites were unmethylated (26). It is evident that HPV activates the methylation machinery via E7/Dnmt1; however, it is not clear how HPV induces *CDH1* repression by epigenetic mechanisms.

Since HR-HPVs E7 has been demonstrated to interact with Dnmt1 and HDAC1, the aim of the current study was to determine the methylation pattern of the *CDH1* promoter region in HeLa, SiHa and Ca Ski cell lines positive for HPV16 and HPV18. Additionally, associations with transcription factors Snail and Snai2, which are negative regulators of *CDH1* expression and inducers of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process (27), were evaluated. HeLa, SiHa and Ca Ski cell lines were selected for the present study, as they are representative of the most frequent cancer types of the uterine cervix with positive HR-HPV infection with different viral loads and epithelial origins, including cervical adenocarcinoma, cervical squamous cell carcinoma and cervical epidermoid carcinoma (28-34).

Materials and methods

Cell lines. As reported by the American type culture collection, HeLa cells are derived from a female African-American patient with uterine cervical adenocarcinoma and are reported to contain 10-50 integrated copies of HPV18 per cell (30-36). SiHa cells are derived from a female Asian patient with grade II cervical squamous cell carcinoma and are reported to contain 1-2 integrated copies of HPV16 per cell (29,30,33,36). Ca Ski cells are derived from a female Caucasian patient with cervical epidermoid carcinoma and are reported to contain 500-600 integrated copies of HPV16 per cell (28,30,36). HaCaT is a non-tumorigenic immortalized human epidermal cell line derived from skin keratinocytes. All cell lines were authenticated through STR DNA profiling (ID no. DP0297) by the University of Colorado DNA Sequencing & Analysis Core. HeLa, SiHa and HaCaT cell lines (ATCC) were cultured in DMEM (cat. no. 12800-058; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.); Ca Ski cells were cultured in RPMI medium (cat. no. 31800-014; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). All cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; cat. no. 16000-044; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 1X penicillin-streptomycin (cat. no. 15140122; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and were incubated in a humidified chamber at 37°C with 5% CO₂.

Untransfected MCF-7 cells and MCF-7 cell stable clones transfected with a pcDNA 3.1 expression vector (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc) with the bicistronic E6/E7 region from HPV18 (MCF-7 pE6/E7) were kindly provided by Dr Erick de la Cruz Hernández (Juarez Autonomous University of Tabasco, Villahermosa, Mexico) and were cultured with 800 μ g/ml Geneticin in DMEM/F12 for 3 weeks as previously described (37-39). Untransfected C33-A cells and C33-A cell stable clones transfected with a pcDNAE7 plasmid (C33-A pE7/HPV16) were kindly provided by Dr Patricio Gariglio (CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico) and were cultured with 800 μ g/ml Geneticin in DMEM for 2 weeks as previously described (40).

Treatments with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AzadC) and trichostatin A (TSA). 5-AzadC causes DNA demethylation or hemi-demethylation that results in gene activation by inhibiting Dnmt activity (41). TSA has been used as a histone deacetylase inhibitor, which causes histone hyperacetylation that leads to chromatin relaxation and modulation of gene expression (42). 5-AzadC and TSA were obtained from Sigma-Aldrich; Merck KGaA (cat. nos. A3656 and T8552, respectively) and resuspended in DMSO (Sigma-Aldrich; Merck KGaA; cat. no. D8418) to obtain working stock solutions (10.0 mM 5-AzadC and 1.0 mM TSA). The 5-AzadC and TSA stock solutions were aliquoted, protected from light and stored at -80°C for later use. A total of 4.5×10^5 HeLa and 5×10^5 SiHa cells were seeded in p60 boxes in triplicate and were treated with 5 and 10 μ M 5-AzadC and 200 and 500 nM TSA. Untreated cells or cells treated with DMSO were used as controls. The total volume of culture medium was 3 ml, which was supplemented with 10% FBS and did not contain any antibiotics. Assays were performed protected from light and the cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂. The culture medium was replaced after 24 h due to the half-life of 5-AzadC and TSA.

Transfection with short interfering RNA (siRNA). siRNAs targeting HPV16 and HPV18 E7 were designed as previously described (43,44) and obtained from Ambion (Thermo Fisher Scientific, Inc.; cat. nos. s237642 and s237640). Silencer[®] Select GAPDH siRNA (Hs, Mm, Rn) (cat. no. 4390849; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) was used as a positive transfection control to select the transfection agent (Lipofectamine[®] 2000 or siPORT[™] NeoFX[™]) and to optimize gene silencing without affecting cell viability according to the manufacturer's protocol and as previously described (45-50). siRNAs were resuspended in UltraPure[™] DNase/RNase-free distilled water (cat. no. 10977-015; Thermo Fisher Scientific, Inc.) to obtain a working stock of 10 μ M. siRNAs were then aliquoted and stored at -80°C for later use.

Transfection with siRNA was performed in triplicate using the siPORT[™] NeoFX[™] kit (cat. no. AM4511; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. A total of 7.5×10^4 HeLa and 8.0×10^4 SiHa cells/well were seeded in a 12-well plate. HeLa cells were transfected with 30 nM siRNA against HPV18 E7, whereas SiHa cells were transfected with 30 nM siRNA against HPV16 E7. In addition, 30 nM siRNA targeting GAPDH was transfected as a positive control in both cell lines. Cells subjected to treatment with siPORT[™] NeoFX[™] Transfection Agent with Opti-MEM[®] I (cat. no. 31985070; Thermo Fisher Scientific, Inc.) were used as a reference control to obtain the relative values, and untransfected cells were used as a reference control for statistical comparisons. Culture medium supplemented with 12% FBS and no antibiotics was added to make up a final transfection volume of 1.2 ml. Cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO₂ and subsequently the extraction of nucleic acids and proteins was performed. Transfection efficiency was determined by measuring the expression of E7 and GAPDH at the mRNA level.

Bisulfite conversion and DNA methylation analysis. Total genomic DNA was isolated from the treated and transfected

cell lines using the Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (cat. no. A1120; Promega Corporation) and 1.5 μ g genomic DNA was treated with bisulfite according to the manufacturer's protocol of the EZ DNA Methylation-Gold[™] kit (cat. no. D5006; Zymo Research Corp.). Methylation of CpG sites at the CDH1 promoter region was analyzed by the bisulfite sequencing PCR (BSP) protocol (Fig. 1A) (10-12,51,52) using oligonucleotides for MSP-protocol provided by Dr Alfonso Dueñas-Gonzalez (INCan-UNAM, Mexico City, Mexico); the PCR conditions for MSP-protocol were the same as those used for the BSP protocol. PCR was performed with a total volume of 25 μ l, containing 1X PCR Gold Buffer, 1 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 10 pMol forward CDH1-BSP (5'-TTTTAGTAATTTAGGTTAGAGGTTAT-3') and reverse CDH1-BSP (5'-AACTCACAAATACTTTACAATTCC-3') oligonucleotides, 1 U AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase (cat. no. 4338856; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 300 ng bisulfite-treated DNA. The thermocycling conditions were as follows: 95°C for 7 min, followed by 35 cycles of 95°C for 35 sec, 57°C for 35 sec and 72°C for 60 sec, and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were treated using ExoI (cat. no. EN0581; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and SAP (cat. no. EF0651; Thermo Fisher Scientific, Inc.) enzymes. The treated PCR products were sequenced using the BigDye[®] v3.1 Cycle Sequencing kit (cat. no. 4337455; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol in an ABI PRISM[™] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The BSP oligonucleotides were designed by MethPrimer v2.0 software (The Li Lab; PUMCH; Chinese Academy of Medical Sciences) using GenBank sequence DQ335132.1 for the CDH1 gene (53). The sequencing data obtained from BSP were analyzed using Chromas v2.6.4 software (Technelysium Pty., Ltd.) and Lasergene v7 package (DNASTAR, Inc.).

RNA extraction and reverse transcription-quantitative (RT-q) PCR. Total RNA was extracted from the treated and transfected cells using TRIzol[®] reagent (cat. no. 15596026; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The RNA was treated with DNase I (cat. no. EN0521; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and purified with Direct-zol[™] RNA MicroPrep (cat. no. R2060; Zymo Research Corp.) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was obtained from the purified RNA using the SuperScript[™] IV First-Strand Synthesis system (cat. no. 18091050; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. The RNA-primer mix was incubated at 65°C for 5 min and 4°C for 1 min, and the RT reaction mix was incubated at 55°C for 15 min and 80°C for 10 min to inactivate the reaction and placed on ice for subsequent use. Subsequently, 60 ng cDNA was subjected to qPCR to determine the expression levels of the genes of interest using the primers listed in Table I. qPCR conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 20 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 35 sec, and a final extension at 72°C for 7 min. This was followed by a melting curve analysis at 65-95°C. All qPCR assays were analyzed using Rotor-Gene Q Series v2.1.0 software (Qiagen, Inc.).

To obtain expression levels of CDH1, SNAI1, SNAI2, HPV16 E7 and HPV18 E7 in the HeLa, SiHa, Ca Ski and

Table I. Primer sequences used for the BSP and qPCR assays.

Gene	Assay	Primer sequences (5'→3')
CDH1	BSP	F: TTTTAGTAATTTTAGGTTAGAGG GTTAT
		R: AAATCACAATACTTTACAAT CC
CDH1	qPCR	F: GTCAGTTCAGACTCCAGCCC R: AAATCAGCTGCCCCAGGACG
SNAI1	qPCR	F: ACCACTATGCCGCGCTCTT R: GGTCGTAGGGCTGCTGGAA
SNAI2	qPCR	F: GACCTGGTTGCTTCAAGGA R: TGTTCAGTGAGGGCAAGAA
E7 HPV16	qPCR	F: CAGCTCAGAGGAGGAGGATG R: TGCCCATTAACAGGCTCTCC
E7 HPV18	qPCR	F: TGAATTCGGTTGACCTTC R: CACGGACACACAAAGGACAG
GAPDH	qPCR	F: AAGTTCGGAGTCAACGGATTG R: CCATGGGTGGAATCATATTGGAA
HPRT	qPCR	F: GGACTAATTATGGACAGGACTG R: GCTCTCAGTCTGATAAAATCT AC

BSP, bisulfite sequencing PCR; qPCR, quantitative PCR.

HaCaT cells, a commercial sample of RNA extracted from normal cervix negative for HPV (Human Cervix Total RNA; cat. no. AM6992; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) was used as a reference. The ΔCq values for each gene were normalized to the reference gene *GAPDH* using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (54). The commercial sample of normal cervix negative for HPV was set as 1, and the results are not presented. For statistical analysis, the HaCaT cell line was used for comparison. For experiments involving the treatment of HeLa and SiHa cells with 5-AzadC and TSA, cells treated with DMSO were used as a reference, but data were not included in the graphs. For experiments involving the transfection of HeLa and SiHa cells with siRNAs, the cells treated with siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent with Opti-MEM® I were used as a reference, but results were not included in the graphs. ΔCq values of *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, HPV16 E7 and HPV18 E7 were normalized using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (39) with *GAPDH* as reference for 5-AzadC and TSA treatments, and *HPRT* as reference for experiments involving siRNA transfections. For statistical analysis, untreated (Unt) HeLa and SiHa cells were used for comparisons.

Protein extraction and western blot analysis. Proteins were obtained using a lysis buffer containing 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Nonidet-P40 and 1.2 mg/ml cOmplete™ protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science). Protein extracts were forced through a 22-gauge needle 10 times and centrifuged for 10 min at 17,000 xg at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford method. Subsequently, 30 mg protein was loaded and separated on 12% SDS-PAGE gels followed by transfer to

nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in 1X TBST with 0.1% Tween-20 (TBST) at 4°C for 1 h with gentle agitation and incubated overnight at 4°C with antibodies against E-cadherin (cat. no. sc-8426; 1:1,000), GAPDH (cat. no. sc-48167; 1:1,000), β -actin (cat. no. sc-1616; 1:1,000; all from Santa Cruz Biotechnology, Inc.), Snai1 (cat. no. L70G2; 1:1,000; Cell Signaling Technology, Inc.) and Snai2 (cat. no. C19G7; 1:1,000; Cell Signaling Technology, Inc.) diluted in TBST with 5% BSA (cat. no. 9998; Cell Signaling Technology, Inc.). Subsequently, membranes were incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature, including goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP; cat. no. sc-2005; 1:10,000), donkey anti-rabbit IgG-HRP (cat. no. sc-2313; 10,000) and donkey anti-goat IgG-HRP (cat. no. sc-2020; 1:5,000; all from Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted in TBST with 5% non-fat dry milk. Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (EMD Millipore) was used for protein detection, and images were acquired using C-DiGit Blot scanner equipment (Li-Cor Biosciences) and processed in the Image Studio™ Lite version 5.2 software (Li-Cor Biosciences).

Nitrocellulose membranes were incubated with two primary antibodies in the following manner: i) Incubation was performed as described against a primary antibody, including E-cadherin, Snai1 or Snai2 with their respective secondary antibody; ii) images were acquired; iii) membranes were washed 3x5 min with TBST at room temperature; iv) membranes were re-probed with a second primary antibody, including GAPDH or β -actin with their respective secondary antibody; and v) images were acquired.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, Inc.). One-way ANOVA with Turkey's post hoc test were used to evaluate significant differences in gene expression and methylation levels, and results were presented as the mean \pm SD. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Different methylation patterns in the CDH1 promoter region are present in HPV16- and HPV18-positive cancer cell lines. A common site-specific methylation pattern in certain CpG islands (-160, -150, -131 and -122) of the *CDH1* promoter region was detected in HeLa and SiHa cells, whereas other CpG islands (-45, -136, -105, -103, -83, -57, -52, -45, -36, -13, +6 and +9) were identified to be methylated in HeLa only (Fig. 1B). Of note, Ca Ski cells did not exhibit methylation of any of the 17 CpG sites of the *CDH1* promoter that were analyzed (Fig. 1B). Quantification of the methylation levels in the *CDH1* promoter region indicated that HeLa presented a methylation frequency of 88.24%, SiHa cells exhibited a methylation frequency of 17.65% and Ca Ski cells demonstrated no methylation (frequency, 0%; Fig. 1C).

Based on previous studies (25-28), initial experiments were conducted using the C33-A, C33-A transfected with pE7/HPV16 (C33-A pE7/HPV16), MCF-7 and MCF-7 transfected with pE6/E7 from HPV18 (MCF-7 pE6/E7) cell lines as HPV-negative cancer models. Validation of C33-A and MCF-7 cell stable clone selection with pE7/HPV16

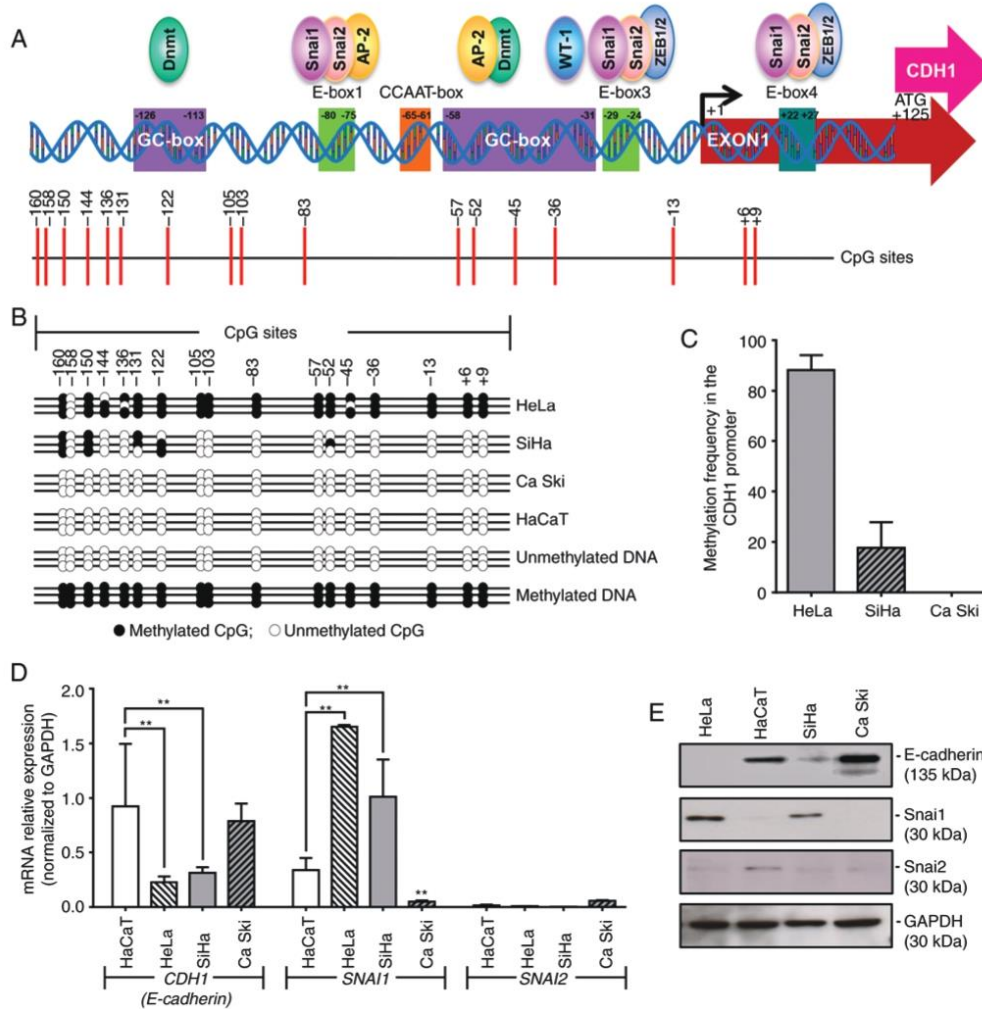


Figure 1. Methylation of the *CDH1* gene promoter region. (A) The location of different elements, the E-box and GC box motifs that regulate transcription of *CDH1*. Red vertical lines indicate each CpG site contained in the promoter region. (B) A lollipop methylation diagram of bisulfite sequencing of the *CDH1* promoter in the HeLa, SiHa, Ca Ski and HaCaT cell lines. Black indicates a methylated CpG site; white indicates an unmethylated CpG site. (C) Quantification of the methylation frequency of the *CDH1* promoter in the HeLa, SiHa and Ca Ski cell lines. (D) Quantitative PCR was performed to measure the expression levels of *CDH1*, *SNAI1* and *SNAI2* genes in the indicated cell lines. *P<0.05 and **P<0.01 vs. HaCaT. (E) Protein expression levels of E-cadherin, Snai1 and Snai2 were assessed by western blot analysis in HPV-positive cell lines. GAPDH was used as a loading control. *CDH1*, cadherin 1; Dnmt1, DNA methyltransferase 1; AP-2, activating protein 2; ZEB1/2, zinc finger E-box-binding homeobox 1/2.

and pE6/E7, respectively, was performed by evaluating E7 mRNA expression by RT-PCR (Fig. S1B). However, C33-A vs. C33-A pE7/HPV16 and MCF-7 vs. MCF-7 pE6/E7 did not exhibit any differences in the methylation of *CDH1* promoter regions (Fig. S1A) or in the expression of CDH1 at mRNA and protein levels (Fig. S1B and C). As the MCF-7 cell line is an adenocarcinoma that derives from the mammary gland and exhibits an epithelial phenotype with a high expression level of CDH1, similar to that observed in Ca Ski cells, and since the C33-A cell line originally does not express CDH1, C33-A and

MCF7 cells were eliminated from the study; neither the effect of oncoprotein E7 on the suppression of *CDH1* expression, nor the methylation patterns in the *CDH1* promoter could be evaluated in these cells.

Methylation levels in the *CDH1* promoter are associated with the mRNA and protein expression levels of *CDH1*. Analysis of *CDH1* expression in the different cell lines demonstrated a significant decrease of the *CDH1* mRNA level in the HeLa (P<0.001) and SiHa (P<0.01) cell lines compared

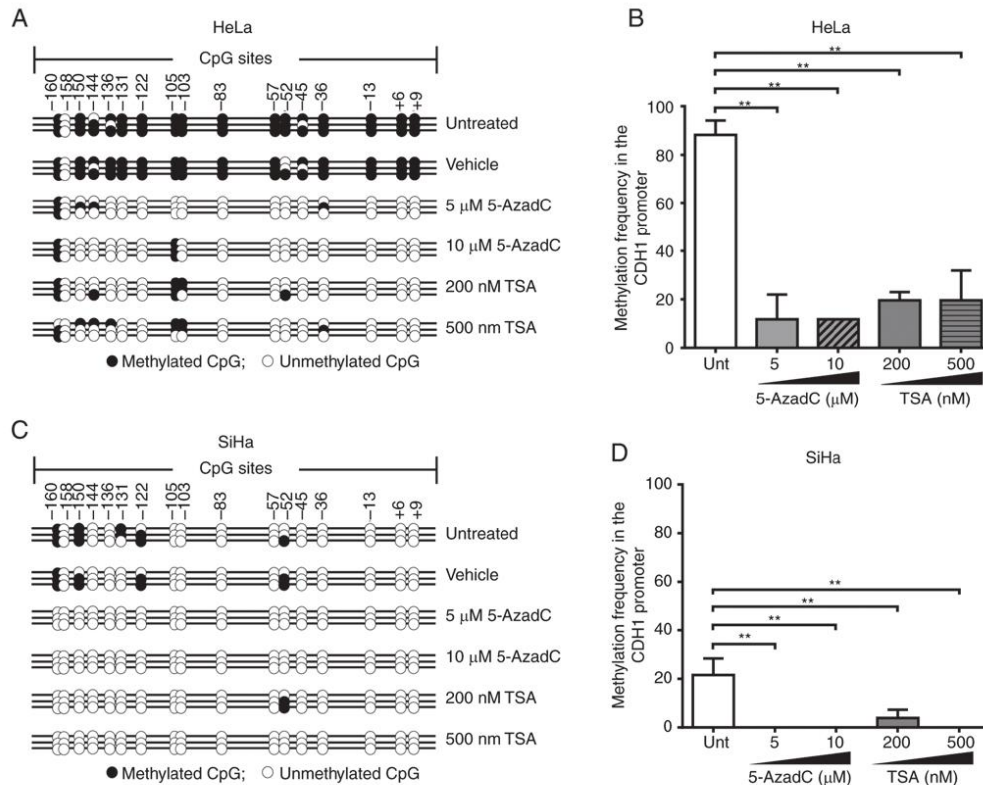


Figure 2. Changes in the methylation pattern of the *CDH1* promoter in HeLa and SiHa cell lines following treatment with 5-AzadC and TSA. (A and C) Lollipop methylation diagrams demonstrating changes in the methylation pattern in CpG sites of the *CDH1* promoter region in (A) HeLa and (C) SiHa cell lines following treatments with 5-AzadC and TSA compared with Unt and vehicle-treated cells. Black indicates a methylated CpG site; white indicates an unmethylated CpG site. (B and D) Quantification of the methylation frequency of the *CDH1* promoter in (B) HeLa and (D) SiHa cell lines following treatment with the indicated concentrations of 5-AzadC and TSA compared with untreated cells. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. Unt, untreated; *CDH1*, cadherin 1; 5-AzadC, 5-aza-2'-deoxycytidine; TSA, trichostatin A.

with the HaCaT cell line (Fig. 1D). A similar decrease was observed at the protein level (Fig. 1E). By contrast, the Ca Ski cell line exhibited high *CDH1* expression, similar to the control HaCaT cell line, at the mRNA and protein level (Fig. 1D and E).

CDH1 expression level is associated with the expression level of *SNAI1*. The present study measured the expression of *SNAI1* and *SNAI2* to test the hypothesis that the expression of *CDH1* is regulated by the transcription factors Snail and Snai2, which mediate EMT by negatively regulating the expression of *CDH1* (27,55-57). The results revealed that the mRNA expression level of *SNAI1* is significantly increased in HeLa ($P < 0.0001$) and SiHa cells ($P < 0.001$), but significantly reduced in Ca Ski cells ($P < 0.01$) compared with HaCaT cells (Fig. 1D). This result was also reflected at the protein level (Fig. 1E). No significant differences were observed in the expression of *SNAI2* at the mRNA (Fig. 1D) and protein (Fig. 1E) level among all cell lines. Since the Ca Ski cell line exhibits a non-mesenchymal phenotype, a high expression

level of E-cadherin and low expression levels of Snail and Snai2, this cell line was excluded from further analysis.

Treatment with 5-AzadC and TSA affect methylation and re-expression of CDH1. HeLa and SiHa cells were treated with different concentrations of 5-AzadC and TSA, and by analysis of the expression levels of *CDH1*, *SNAI1*, and *SNAI2*. HeLa and SiHa cells treated with the vehicle (DMSO) were used for normalizing the expression values, as well for performing comparisons in statistical analysis.

The results demonstrated that in the HeLa cell line, the methylation pattern was maintained at CpG sites -103, -105, and -160 of the *CDH1* promoter region following treatment with 5-AzadC and TSA. By contrast, in the SiHa cell line, this region was completely demethylated following treatment with 5 or 10 μ M 5-AzadC or 500 nM TSA, and only CpG site -52 was methylated following treatment with 200 nM TSA (Fig. 2A and C). Compared with untreated HeLa and SiHa cells, a decrease in methylation of 76.48% was observed following 5 or 10 μ M 5-AzadC treatment, whereas following

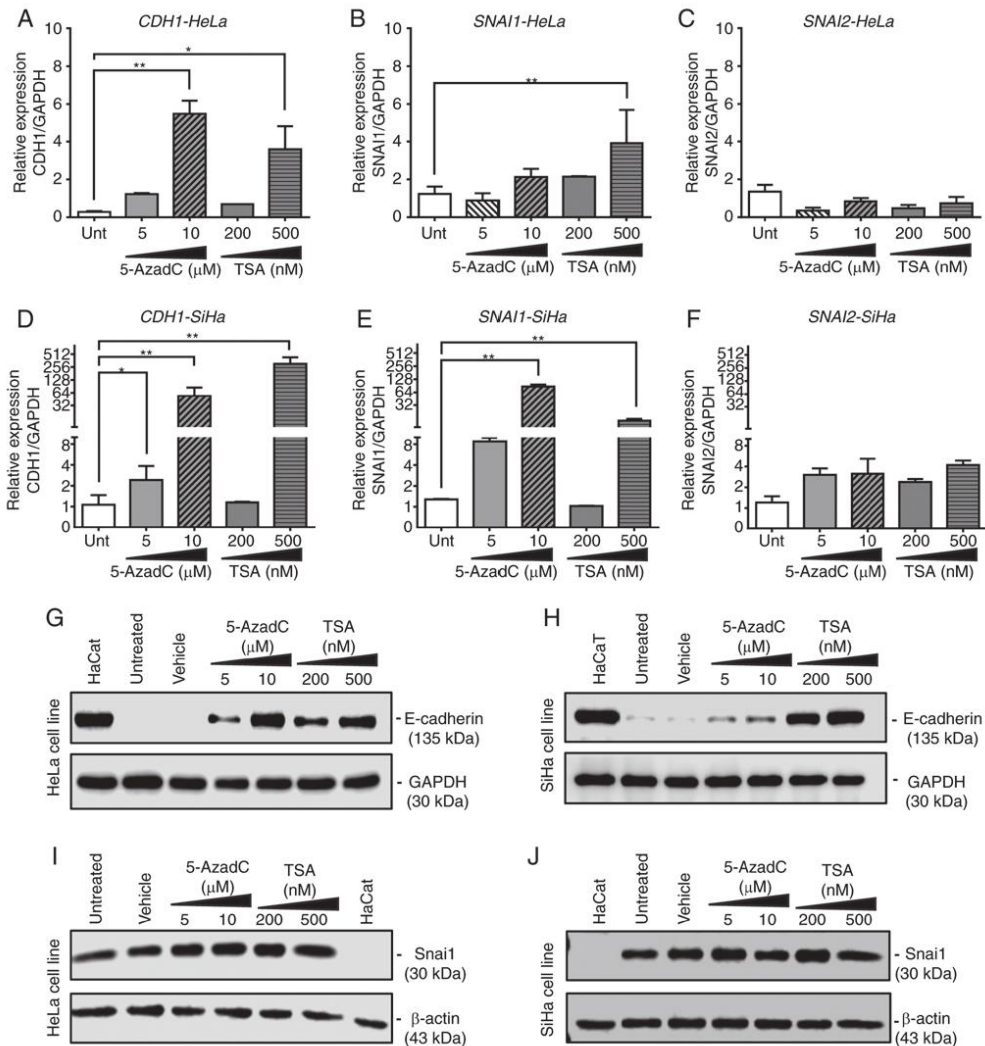


Figure 3. Changes in the expression levels of *CDH1*, *SNAI1* and *SNAI2* in HeLa and SiHa cells following treatment with 5-AzadC and TSA. (A-F) Quantitative PCR analyses of *CDH1*, *SNAI1* and *SNAI2* mRNA expression levels in (A-C) HeLa and (D-F) SiHa cells following treatments with 5-AzadC and TSA compared with untreated cells; *P<0.05 and **P<0.01 vs. untreated cells. (G and H) Protein expression of E-cadherin in (G) HeLa and (H) SiHa cell lines. (I and J) Protein expression of Snai1 in (I) HeLa and (J) SiHa cell lines following the indicated treatments. Unt, untreated; *CDH1*, cadherin 1; 5-AzadC, 5-aza-2'-deoxycytidine; TSA, trichostatin A.

treatment with 200 or 500 nM TSA, a decrease in methylation of 68.63% was observed. By contrast, in SiHa cells, a decrease of 21.57% was observed following treatment with 5 or 10 μM 5-AzadC or 500 nM TSA, whereas following treatment with 200 nM TSA, a 17.65% decrease in methylation was observed. Therefore, it was demonstrated in the two cell lines that treatment with 5-AzadC or TSA significantly diminished the level of *CDH1* methylation (P<0.001; Fig. 2B and D). However, no significant differences were observed between the two treatments in diminishing the methylation levels of *CDH1*.

In the HeLa cell line, treatments with 10 μM 5-AzadC (P=0.004) and 500 nM TSA (P=0.03) significantly increased the expression of *CDH1* mRNA and protein (Fig. 3A and G). In addition, 500 nM TSA significantly increased the mRNA expression of *SNAI1* (P=0.01, Fig. 3B) in HeLa cells without notable changes in protein expression (Fig. 3I). In the SiHa cell line, the mRNA expression of *CDH1* significantly increased following treatment with 5-AzadC at 5 and 10 μM (P<0.05 and P<0.01, respectively) or 500 nM TSA (P=0.004; Fig. 3D); a similar effect was observed at the protein level (Fig. 3H).

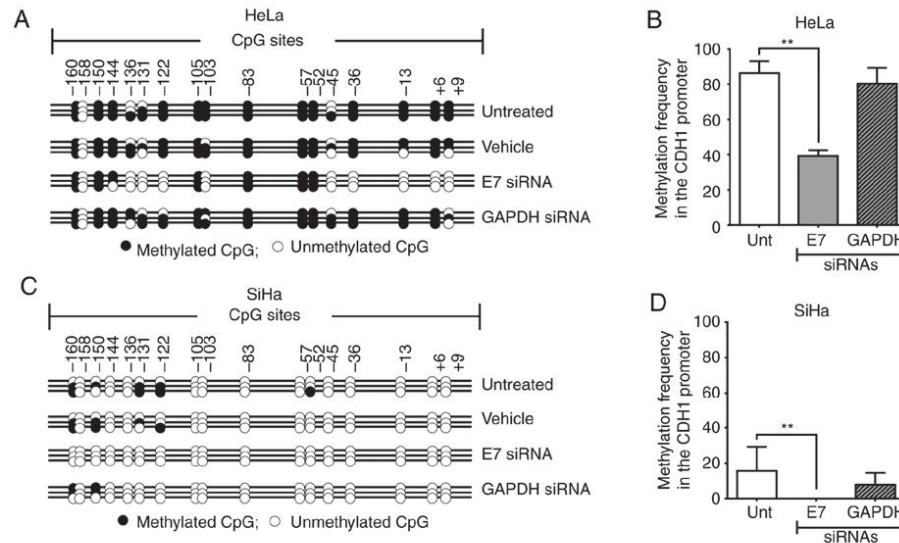


Figure 4. Silencing of E7 from HPV18 and HPV16 modifies the methylation pattern of the *CDH1* promoter in HeLa and SiHa cells. (A and C) Lollipop methylation diagrams demonstrating changes in the methylation pattern in CpG sites of the *CDH1* promoter region in (A) HeLa and (C) SiHa cell lines following transfection with siRNA targeting *E7* and *GAPDH* compared with Unt and vehicle control cells. Black indicates a methylated CpG site; white indicates an unmethylated CpG site. (B and D) Methylation frequency of the *CDH1* promoter in (B) HeLa and (D) SiHa cells following transfection with siRNA targeting *E7* from HPV18, *E7* from HPV16 and *GAPDH* compared with untreated cells. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. *CDH1*, cadherin 1; Unt, untreated; siRNA, small interfering RNA; HPV, human papilloma virus.

In addition, the expression of *SNAI1* mRNA was significantly increased following treatment with $10 \mu\text{M}$ 5-AzadC ($P=0.004$) or 500 nM TSA ($P=0.01$) (Fig. 3E) in SiHa cells without notable changes at the protein level (Fig. 3J), similar to that observed in HeLa.

5-AzadC and TSA also increased the mRNA expression level of *SNAI1* in the HeLa (Fig. 3B) and SiHa cell lines (Fig. 3E); however, no changes were observed in *SNAI1* protein levels in the two cell lines (Fig. 3I and J). The expression of *SNAI2* was not significantly modified at the mRNA level under any treatment condition in the tested cell lines (Fig. 3C and F).

Suppression of E7 by siRNA modifies the methylation patterns of the CDH1 promoter and induces CDH1 expression in HeLa and SiHa cell lines. To examine the involvement of *E7* in the *CDH1* methylation and expression patterns, HeLa and SiHa cell lines were transfected with siRNA against *E7*, which resulted in 57.9 and 42.5% reduction in the *E7* mRNA level, respectively (Fig. 5A and C). In the HeLa cell line, *E7* silencing led to demethylation of *CDH1* CpG promoter sites located between +9 and -45, as well as at -103 and between -122 and -136 (Fig. 4A). In addition, in the SiHa cell line, total demethylation of the *CDH1* promoter was observed following *E7* silencing (Fig. 4C). Therefore, partial silencing of *E7* in HeLa and SiHa cells yielded a significant decrease in *CDH1* promoter methylation compared with untreated control cells ($P < 0.001$; Fig. 4B and D). Increased *CDH1* mRNA and protein levels were observed following *E7* silencing in HeLa (Fig. 5B and F) and SiHa (Fig. 5B and G) cells. The use of

Silencer® Select *GAPDH* siRNA as a positive control siRNA excluded the possibility that changes in the methylation pattern of the *CDH1* promoter were due to the siRNA transfection conditions as *GAPDH* silencing did not induce significant changes in the methylation pattern of the *CDH1* promoter in HeLa ($P=0.7140$; Fig. 4B) and SiHa ($P=0.3248$; Fig. 4D) cells; therefore, the changes in the methylation pattern were likely due to *E7* silencing.

Suppression of E7 inhibits SNAI1 and SNAI2 expression in HeLa and SiHa cells. Silencing of *E7* not only induced the expression of *CDH1*, but also significantly decreased the expression of *SNAI1* and *SNAI2* ($P < 0.001$) in HeLa and SiHa cells (Fig. 5D, E, H and I). This suggested that *E7* may be not only involved in suppressing the expression of *CDH1*, but may also regulate the expression of *SNAI1* and *SNAI2*, which negatively regulate *CDH1*. No significant changes were observed in the mRNA expression of *E7*, *CDH1*, *SNAI1* and *SNAI2* following *GAPDH* silencing in HeLa and SiHa cells ($P > 0.5$; Fig. 5A, B, D and E). However, silencing of *GAPDH* with siRNA resulted in a decrease in the protein expression of *SNAI1* in HeLa cells (Fig. 5H).

As housekeeping genes *GAPDH* and *HPRT* were used to normalize the expression levels of the genes studied, no significant differences were noted in the reduction of *SNAI1* expression at the mRNA level (Fig. 5D). Further analysis of the expression levels of *GAPDH*, *CDH1* and *SNAI1* genes normalized against β -actin demonstrated that *GAPDH* expression was 2.6-fold higher in HaCaT, 1.6-fold higher in HeLa, 3.3-fold higher in SiHa and 3.8-fold higher in Ca Ski cells

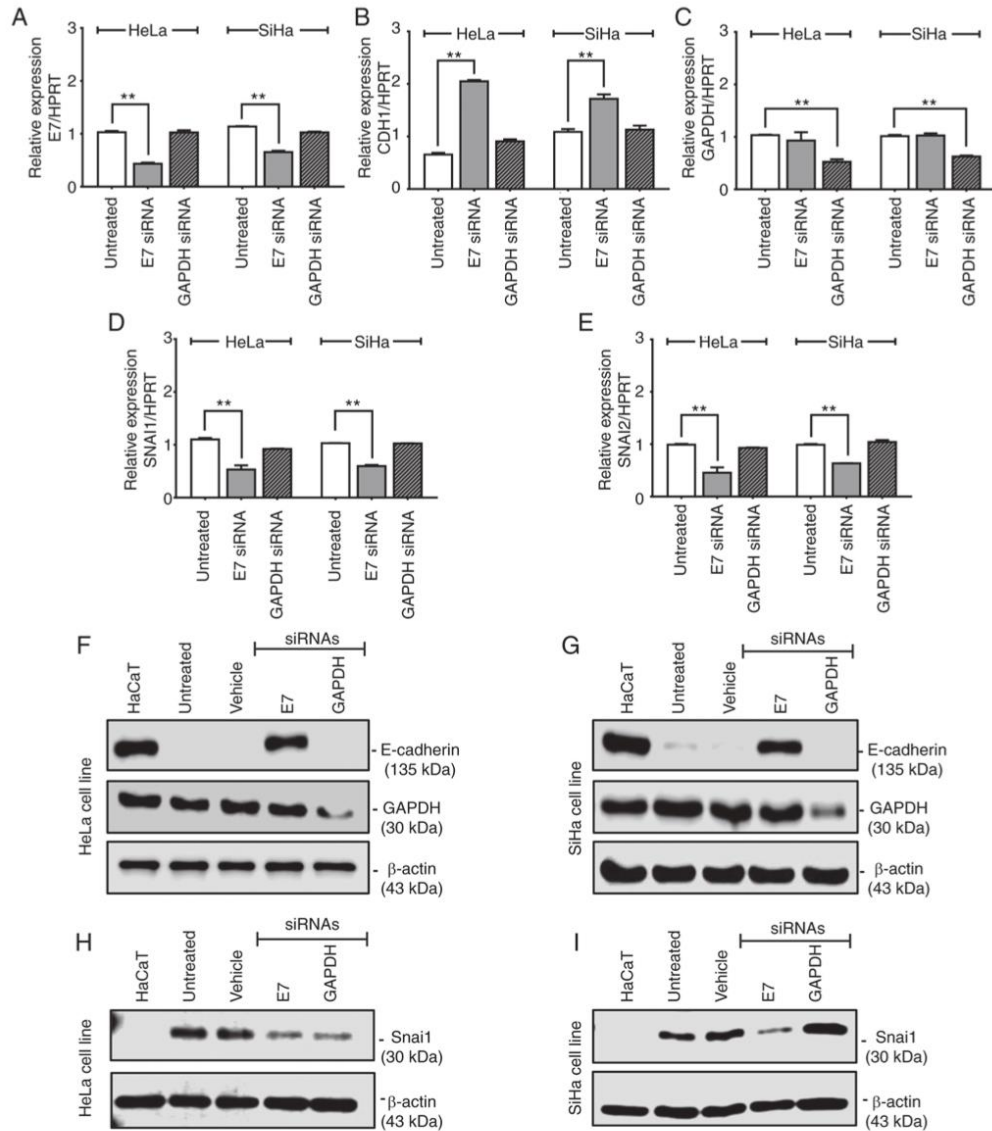


Figure 5. Silencing of E7 from HPV18 and HPV16 modifies the expression of *CDH1* and *SNAI1* genes in HeLa and SiHa cell lines. (A-E) The relative mRNA expression levels of (A) *E7*, (B) *CDH1*, (C) *GAPDH*, (D) *SNAI1* and (E) *SNAI2* in HeLa and SiHa cell lines following transfection with siRNA against *E7* and *GAPDH*. * $P < 0.01$ vs. untreated cells. E-cadherin, Snai1, GAPDH and β -actin protein expression levels in (F and H) HeLa and (G and I) SiHa cells following transfection with siRNA targeting *E7* and *GAPDH*. *CDH1*, cadherin 1; siRNA, small interfering RNA; HPV, human papilloma virus.

compared with a commercial sample of RNA extracted from normal cervical tissue (Fig. S2).

Discussion

HR-HPV activates the cell methylation machinery, which not only methylates its own genome, but also the promoter regions

of cellular genes (21). Laurson *et al* (26) have demonstrated that E7 induces the expression of Dnmt1 and suppresses the expression of *CDH1*. Reduction of E-cadherin has been reported to contribute to the persistence of HPV, which is in agreement with reports that E7 interacts with and induces the expression of Dnmt1 and triggers its *de novo* methylation activity (16) (Fig. 6A). The results of the present study agree

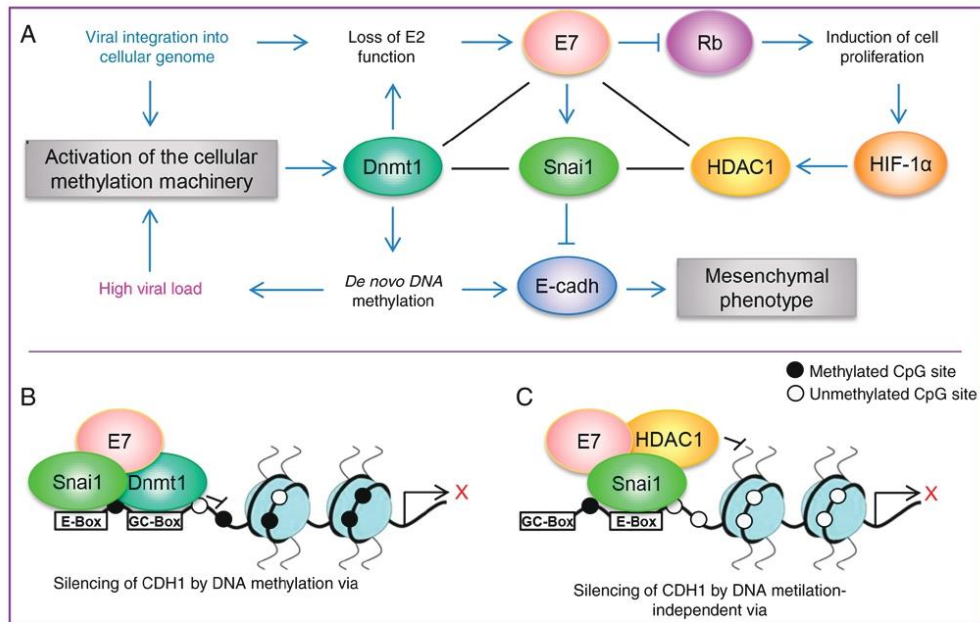


Figure 6. A schematic model demonstrating how high-risk HPV E7 may induce epithelial-mesenchymal transition via Snai1. (A) A schematic model of proteins that interact with or are induced by E7. The loss of E2 function, either from the integration or methylation of the E2 binding sites in the HPV long control region, leads to the dysregulated expression of the oncoproteins E6 and E7. E7 serves an important role in regulating several pathways; E7 induces cellular proliferation via pRB and E7 not only induces the expression of Dnmt1 and HDAC1, but also physically interacts with them, which promotes epigenetic regulation of HPV and cellular genes. The results of the present study indicated that E7 may not only suppresses the expression of *CDH1* through the methylation of its promoter region, but also induce the expression of Snai1, which is a negative regulator of *CDH1* expression. (B and C) Proposed models of how E7 may regulate the expression of *CDH1*. HPV, human papilloma virus; *CDH1*, cadherin 1; Dnmt1, DNA methyltransferase 1; HDAC1, histone deacetylase type 1; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; pRB, retinoblastoma protein.

with previous findings by Laurson *et al* (26), in which E7 from HPV16 suppressed the expression of *CDH1*. However, in this previous study, no significant differences were observed in the methylation pattern of the *CDH1* promoter of NIKS cells overexpressing E7, as the 17 CpG sites analyzed were not methylated (23). In addition, treatment with 5-AzadC re-established the expression of *CDH1* at the mRNA and protein levels (26); however, the concentration of 5-AzadC used was not stated and the changes in the expression of other cellular genes were not discussed.

The present study evaluated the re-expression of *CDH1* at the mRNA and protein levels in HeLa and SiHa cell lines treated with 5-AzadC and TSA, as well as changes in the methylation pattern of the promoter region of *CDH1*. Additionally, although TSA is not a demethylating agent, demethylation in the promoter of *CDH1* following treatment with TSA was observed. This result was an agreement with previous studies that have reported that TSA induces DNA demethylation and proposed that a change in chromatin modification, including the deacetylation of histones induced by an HDAC inhibitor, such as TSA, may render a gene susceptible to DNA demethylation (58,59).

In addition, an increase in *SNAI1* mRNA level was observed after treatment with 500 nM TSA in HeLa cells, whereas in SiHa cells an increase in *SNAI1* mRNA level was

observed after treatment with 10 μ M 5-AzadC and 500 nM TSA; however, no apparent changes were observed in *SNAI1* protein level in the two cell lines. This result was in agreement with studies in which such treatments not only re-established the expression of *CDH1*, but also induced upregulation of *SNAI1* and *SNAI2* at the mRNA level (60,61), which was likely due to modifications in the methylation pattern in the promoter regions of *SNAI1* and *SNAI2* (62). The role of *SNAI1* regulation by epigenetic mechanisms is largely unknown. A previous study has demonstrated that the treatment with 5-AzadC in fibroblast cell IMR90, induced pluripotent stem cells from IMR90, BeWo and HTR8/SVneo cell lines induces a greater expression of *SNAI1* and *SNAI2* at the mRNA level and that the regulation of the two genes is mediated by DNA methylation of their first intron and not due to DNA methylation of their promoter region; however, this previous study did not determine the expression of these genes at the protein level (62). The present study did not determine the methylation status of the *SNAI1* promoter region as it is transcriptionally active in HeLa and SiHa cells. The differences observed in the effect on *SNAI1* expression at the mRNA and protein levels by treatment with 5-AzadC and TSA indicated that other factors may regulate the expression of *SNAI1* in the two cell lines.

On the other hand, the results published by Laurson *et al* (26) suggested that in the NIKS-cell model, suppression of *CDH1*

expression by E7 was independent of the methylation status of the *CDH1* promoter region, which was observed in the SiHa cell line in the current study. The previous study also suggested that repression of *CDH1* may be regulated via *SNAI2* (*SLUG*); however, it was reported that the expression of *SNAI2* was not altered by the presence of E7 (26). The results of the present study revealed that while *SNAI1* mRNA and protein was expressed in HeLa and SiHa cells, *SNAI2* mRNA expression was barely detectable in HaCaT and Ca Ski cells. *SNAI2* has been demonstrated to be upregulated in HaCaT cells during the process of cell motility and wound-healing (63).

The results of the present study demonstrated that following silencing of E7 from HPV16 and HPV18, *CDH1* expression was recovered in HeLa and SiHa cells, which is in agreement with a previous study by Caberg *et al* (25). This previous study reported that following 24-h transfection of SiHa cells with siRNA against HPV16 E7, *CDH1* was upregulated and an increase of the Retinoblastoma protein (pRB), which is responsible for a major G1 check point, blocking S-phase entry and cell growth, and activating protein 2 α were detected without changes in the mRNA expression levels of *SNAI1* and *SNAI2* (25). By contrast, the present study demonstrated that following 48-h transfection with siRNA against E7, changes in the methylation pattern of the *CDH1* promoter region were observed in HeLa and SiHa cells. In addition, an increase in the mRNA and protein expression levels of *CDH1* were identified, as well as a decrease in the mRNA and protein expression levels of *SNAI1* and *SNAI2*. Therefore, the current results suggested that E7 not only suppressed the expression of *CDH1* via the methylation of its promoter, but also regulated the expression of *SNAI1*, a negative regulator of *CDH1* involved in EMT and associated with metastasis (27,55-57). These observations are also concordant with the mechanism of action reported for other oncogenic viruses, where the X protein of HBV (HBx), core protein of HCV and latent membrane protein 1 (LMP1) of EBV promote EMT and metastasis by inducing the expression *SNAI1* and suppressing *CDH1* expression (64-67).

Following silencing *GAPDH* with siRNA, *SNAI1* expression was partially suppressed in HeLa cells at the protein level, but not at mRNA level. This was consistent with a previous study that demonstrated that the interaction of GAPDH with Sp1 resulted in increased expression of Snail, which promoted the proliferation and metastasis of cancer cells, and that suppression of *GAPDH* with shRNA resulted in a significant decrease of Snail in the HCT116 and LoVo cell lines (68). This suggested that GAPDH may serve a role in the metastasis of cervical adenocarcinoma (HeLa) by affecting EMT through the upregulation of Snail expression mediated by Sp1, similar to its role reported in colon cancer (68), but further studies are required to verify this.

It is currently unknown how HPV may activate the expression of *SNAI1*; however, it has been reported that in other cancer types associated with virus, HBx, core and LMPI proteins increased *SNAI1* expression through the activation of the PI3K/Akt and MAPK pathways by transforming growth factor- β (TGF- β) action (64,69-72), which is in agreement with a previous study by Peinado *et al* (73) suggesting that TGF- β induces *SNAI1* transcription through MAPK and PI3K.

In the present study, the signaling pathways involved in regulating *SNAI1* expression were not determined; however,

previous studies have reported that HR-HPV infection activates the PI3K/Akt/mTOR pathway (74), E7 from HPV upregulates Akt activity through the pRB protein (75) and TGF- β stimulates EMT and tumor invasion in SiHa cells (76).

In summary, the results of the present demonstrated that HR-HPV E7 may regulate the expression of *CDH1* by two different pathways, in which Snail is involved. The first pathway involves hypermethylation of the *CDH1* promoter region and the expression of Snail, as observed in the HeLa cell line. The second pathway involves hypomethylation of the *CDH1* promoter region with expression of Snail as observed in SiHa cell line, suggesting that *CDH1* and *SNAI1* may be considered as biomarkers of metastasis in uterine cervical cancer. Therefore, based on the present results and previous evidence that E7 interacts with Dnmt1 and HDAC1 (15-17), it would be beneficial to determine if E7 from HR-HPV may interact with Snail to form a co-repressor complex with either Dnmt1 or HDAC1 in the *CDH1* promoter (Fig. 6B and C), which may explain the suppression of *CDH1* expression during the EMT process.

Acknowledgements

This study is part of the doctoral dissertation project of Pedro Rosendo Chalma, a Doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; grant no. 203376). The present study was supported by CONACyT (grant no. 253804 to AG-C) and MINECO (grant no. SAF2013-44739-R to AC). The authors would like to thank Ms. Miriam C. Guido Jiménez (UNAM) and Ms. Raquel López Paniagua (INCan) for their technical support, Dr Erick de la Cruz Hernández (Juarez Autonomous University of Tabasco) and Dr Patricio Gariglio (CINVESTAV-IPN) for providing the cell lines and Dr Alfonso Dueñas Gonzalez (INCan-UNAM) for providing the oligonucleotides for *CDH1* used in the MSP-Protocol.

Funding

The present study received additional support of the Fundación Miguel Alemán, A.C. to AGC. PRC received a fellowship from Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP-UNAM) during his doctoral stay at the Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

PRC performed all experiments, interpreted the data and wrote the manuscript. VAV, GDBO and CCPM performed western blot analysis and interpreted the data. AC and AGC conceived and designed the study, interpreted the data and

edited the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D and Bray F: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359-E386, 2015.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
- zur Hausen H: Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology* 384: 260-265, 2009.
- Bansal A, Singh MP and Rai B: Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res* 6: 84-89, 2016.
- Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.
- Doorbar J: Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol* 3: 416-421, 2013.
- Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA and Franceschi S: Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16086, 2016.
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M and Gissmann L: The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66: 1515-1522, 1985.
- Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgarth M, Hillemans HG and Sauer G: Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *J Gen Virol* 69: 187-196, 1988.
- Badal S, Badal V, Calleja-Macias IE, Kalantari M, Chuang LS, Li BF and Bernard HU: The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 324: 483-492, 2004.
- Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, *et al.*: The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome Res* 19: 438-451, 2009.
- Kalantari M, Lee D, Calleja-Macias IE, Lambert PF and Bernard HU: Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. *Virology* 374: 292-303, 2008.
- Boyer SN, Wazer DE and Band V: E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56: 4620-4624, 1996.
- Munger K, Phelps WC, Bub V, Howley PM and Schlegel R: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 63: 4417-4421, 1989.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ and Kouzarides T: The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* 18: 2449-2458, 1999.
- Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, de Launoit Y, Kouzarides T and Fuks F: Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. *Oncogene* 26: 1650-1655, 2007.
- Longworth MS and Laimins LA: The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 78: 3533-3541, 2004.
- Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS and Reinberg D: The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* 95: 279-289, 1998.
- Li H, Ou X, Xiong J and Wang T: HPV16E7 mediates HADC chromatin repression and downregulation of MHC class I genes in HPV16 tumorigenic cells through interaction with an MHC class I promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1315-1321, 2006.
- Georgopoulos NT, Proffitt JL and Blair GE: Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene* 19: 4930-4935, 2000.
- Milutin Gasperov N, Sabol I, Planinić P, Grubišić G, Fistonić I, Corušić A and Groc M: Methylated host cell gene promoters and human papillomavirus type 16 and 18 predicting cervical lesions and cancer. *PLoS One* 10: e0129452, 2015.
- Liu J, Lian Z, Han S, Wayne MM, Wang H, Wu MC, Wu K, Ding J, Arbutnot P, Kew M, *et al.*: Downregulation of E-cadherin by hepatitis B virus X antigen in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25: 1008-1017, 2006.
- McLaughlin-Drubin ME and Munger K: Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1782: 127-150, 2008.
- Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY and Chang YS: The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10084-10089, 2002.
- Caberg JH, Hubert PM, Begon DY, Herfs MF, Roncarati PJ, Boniver JJ and Delvenne PO: Silencing of E7 oncogene restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. *Carcinogenesis* 29: 1441-1447, 2008.
- Laurson J, Khan S, Chung R, Cross K and Raj K: Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. *Carcinogenesis* 31: 918-926, 2010.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F and Nieto MA: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83, 2000.
- Pattillo RA, Hussa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR and Mattingly RF: Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: A new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* 196: 1456-1458, 1977.
- Friedl F, Kimura I, Osato T and Ito Y: Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med* 135: 543-545, 1970.
- Diao MK, Liu CY, Liu HW, Li JT, Li F, Mehryar MM, Wang YJ, Zhan SB, Zhou YB, Zhong RG and Zeng Y: Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines. *Life Sci* 127: 46-52, 2015.
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R and Howley PM: Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119: 361-366, 1985.
- Schneider-Gädick A and Schwarz E: Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5: 2285-2292, 1986.
- Pater MM and Pater A: Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318, 1985.
- Pater MM and Pater A: Expression of human papillomavirus types 16 and 18 DNA sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Med Virol* 26: 185-195, 1988.
- Spence RP, Murray A, Banks L, Kelland LR and Crawford L: Analysis of human papillomavirus sequences in cell lines recently derived from cervical cancers. *Cancer Res* 48: 324-328, 1988.
- Meissner JD: Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol* 80: 1725-1733, 1999.
- De la Cruz-Hernandez E, Garcia-Carranca A, Mohar-Betancourt A, Dueñas-González A, Contreras-Paredes A, Pérez-Cardenas E, Herrera-Goepfert R and Lizano-Soberón M: Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. *J Gen Virol* 86: 2459-2468, 2005.

38. Vazquez-Vega S, Sanchez-Suarez LP, Andrade-Cruz R, Castellanos-Juarez E, Contreras-Paredes A, Lizano-Soberon M, Garcia-Carranca A and Benitez-Bribiesca L: Regulation of p14ARF expression by HPV-18 E6 variants. *J Med Virol* 85: 1215-1221, 2013.
39. Vazquez-Vega S, Sanchez-Suarez LP, Contreras-Paredes A, Castellanos-Juarez E, Peñarroja-Flores R, Lizano-Soberon M, Andrade-Cruz R, Garcia-Carranca A and Benitez-Bribiesca L: Nuclear co-expression of p14ARF and p16INK4A in uterine cervical cancer-derived cell lines containing HPV. *Cancer Biomark* 8: 341-350, 2010-2011.
40. Gutierrez J, Garcia-Villa E, Ocadiz-Delgado R, Cortés-Malagón EM, Vázquez J, Roman-Rosales A, Alvarez-Rios E, Celik H, Romano MC, Uren A, *et al*: Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein upregulates the retinoic acid receptor-beta expression in cervical cancer cell lines and K14E7 transgenic mice. *Mol Cell Biochem* 408: 261-272, 2015.
41. Mompalmer RL: Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol* 32: 443-451, 2005.
42. Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I and Coombes RC: Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* 7: 971-976, 2001.
43. Jiang M and Milner J: Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene* 21: 6041-6048, 2002.
44. Lea JS, Sunaga N, Sato M, Kalahasti G, Miller DS, Minna JD and Muller CY: Silencing of HPV 18 oncoproteins with RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reprod Sci* 14: 20-28, 2007.
45. Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH and Williams BR: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834-839, 2003.
46. Makpol S, Zaimuddin A and Chua KH: GAPDH expression as a measurement of transfection efficiency for p16 INK4a gene silencing (siRNA) in senescent human diploid fibroblasts. *Am J Mol Biol* 2: 390-397, 2012.
47. Han H: RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol Biol* 1706: 293-302, 2018.
48. Borawski J, Lindeman A, Buxton F, Labow M and Gaither LA: Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. *J Biomol Screen* 12: 546-559, 2007.
49. Peter Hahn JD, Wolfgang Bielke and Jie Kang: Patent: EP2240582 B1-Positive controls for expression modulating experiments. European Patent Office, October 23, 2013.
50. Cheng A, Magdaleno S and Vlassov AV: Optimization of transfection conditions and analysis of siRNA potency using real-time PCR. *Methods Mol Biol* 764: 199-213, 2011.
51. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF and Bernard HU: CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: Genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 77: 6227-6234, 2003.
52. Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Lie K, Barrera-Saldana HA, Wiley DJ and Bernard HU: Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. *J Virol* 78: 12762-12772, 2004.
53. Hoffmann I, Hilger M and Mueller O: Homo sapiens promoter of E-cadherin from HEK293 cells. Max-Planck-Institut fuer Molekulare Physiologie, Dortmund, 2006.
54. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
55. Peinado H, Portillo F and Cano A: Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* 48: 365-375, 2004.
56. Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrio D, Peinado H, Rodriguez-Pinilla SM, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, *et al*: Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66: 9543-9556, 2006.
57. Peinado H, Olmeda D and Cano A: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7: 415-428, 2007.
58. Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG and Baylin SB: Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-107, 1999.
59. Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provençal N, Shikimi K, Karimi M, Ekström TJ and Szyf M: Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 73: 1297-1307, 2007.
60. Meng F, Sun G, Zhong M, Yu Y and Brewer MA: Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer. *Br J Cancer* 108: 579-586, 2013.
61. Liu YN, Lee WW, Wang CY, Chao TH, Chen Y and Chen JH: Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene* 24: 8277-8290, 2005.
62. Chen Y, Wang K, Qian CN and Leach R: DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 1083-1090, 2013.
63. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T and Hudson LG: Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 202: 858-866, 2005.
64. Arzumanyan A, Friedman T, Kotei E, Ng IO, Lian Z and Feitelson MA: Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer. *Oncogene* 31: 563-572, 2012.
65. Horikawa T, Yoshizaki T, Kondo S, Furukawa M, Kaizaki Y and Pagano JS: Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 104: 1160-1167, 2011.
66. Liu H, Xu L, He H, Zhu Y, Liu J, Wang S, Chen L, Wu Q, Xu J and Gu J: Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein. *Cancer Sci* 103: 2072-2081, 2012.
67. Nie D, Shan X, Nie L, Duan Y, Chen Z, Yang Y, Li Z, Tian L, Gao Q, Shan Y and Tang N: Hepatitis C virus core protein interacts with Snail and histone deacetylases to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 35: 3626-3635, 2016.
68. Liu K, Tang Z, Huang A, Chen P, Liu P, Yang J, Lu W, Liao J, Sun Y, Wen S, *et al*: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAI1 expression. *Int J Oncol* 50: 252-262, 2017.
69. Liu Y, Xu Y, Ma H, Wang B, Xu L, Zhang H, Song X, Gao L, Liang X and Ma C: Hepatitis B virus X protein amplifies TGF- β promotion on HCC motility through down-regulating PPM1a. *Oncotarget* 7: 33125-33135, 2016.
70. Park GB, Kim D, Kim YS, Kim S, Lee HK, Yang JW and Hur DY: The Epstein-Barr virus causes epithelial-mesenchymal transition in human corneal epithelial cells via Syk/src and Akt/Erk signaling pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 1770-1779, 2014.
71. Sides MD, Klingsberg RC, Shan B, Gordon KA, Nguyen HT, Lin Z, Takahashi T, Flemington EK and Lasky JA: The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor- β 1 synergistically induce epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44: 852-862, 2011.
72. Taniguchi H, Kato N, Otsuka M, Goto T, Yoshida H, Shiratori Y and Omata M: Hepatitis C virus core protein upregulates transforming growth factor-beta 1 transcription. *J Med Virol* 72: 52-59, 2004.
73. Peinado H, Quintanilla M and Cano A: Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278: 21113-21123, 2003.
74. Surviladze Z, Sterk RT, DeHaro SA and Ozbun MA: Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J Virol* 87: 2508-2517, 2013.
75. Menges CW, Baglia LA, Lapoint R and McCance DJ: Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res* 66: 5555-5559, 2006.
76. Yi JY, Hur KC, Lee E, Jin YJ, Arteaga CL and Son YS: TGF β 1-mediated epithelial to mesenchymal transition is accompanied by invasion in the SiHa cell line. *Eur J Cell Biol* 81: 457-468, 2002.

XV. ANEXO II - Solicitud de patente mexicana No. MX/a/2019/014593



MX/E/2019/083686

MX/a/2019/014593

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES.
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE PATENTES.

COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE RECEPCIÓN Y CONTROL DE DOCUMENTOS.

EXPEDIENTE: MX/a/2019/014593
FOLIO DE RECEPCIÓN: MX/E/2019/083686
IDENTIFICADOR DE LA SOLICITUD: 20380
LUGAR, FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN DE LA SOLICITUD:
CIUDAD DE MÉXICO 04/12/2019 03:26:31

ACUSE DE RECIBO DE LA SOLICITUD DE:

Patente

SOLICITANTE(S) O REPRESENTANTE LEGAL:

ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA

DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD:

DOCUMENTO	NOMBRE ARCHIVO	TAMAÑO	HOJA(S)
SOLICITUD	Solicitud_000020380_04_12_2019.pdf	435.05 KB	6
COMPROBANTE DE PAGO	Pago.pdf	24.33 KB	1
HOJA DE DESCUENTO	HOJA DE DESCUENTO.pdf	25.25 KB	1
PODER NOTARIAL	NOMBRAMIENTO Y PODER ROCIO S_1 (1).pdf	1973.76 KB	14
DOCUMENTO COMPROBATORIO DE DIVULGACION PREVIA	04 Abstract - ICGEB DNA Tumor Virus Meeting - AGC.pdf	1218.08 KB	1
MEMORIA_TECNICA	01 Patente - Descripción, Reivindicaciones y Resumen - Noviembre 2019.pdf	188.37 KB	28
DIBUJOS	02 Capítulo de figuras - Noviembre 2019.pdf	1342.54 KB	8
CONSTANCIA DE DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO	DP0297 Cell lines Profile Analyses.pdf	165.96 KB	6
OTROS	03 Cesión de derechos de los inventores del INCan.pdf	2051.05 KB	6

TOTAL DE HOJAS: 71 (No se incluyen hoja(s) del acuse)

Bajo protesta de decir verdad declaro, que se encuentra en el supuesto con respecto al beneficio señalado en la Cuarta Disposición General de la Tarifa por los servicios que presta este Instituto, por lo que solicito el 50% de descuento de la tarifa establecida, para los artículos que aplique dicho descuento. Se hace la presente declaración en cumplimiento de dicha disposición, según el acuerdo por el que se da a conocer la tarifa por los servicios que presta el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicado en el Diario Oficial de la Federación con fecha 23 de agosto de 1995.

Los documentos adjuntos están sujetos al estudio correspondiente que el Instituto realice de conformidad con la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

La presente solicitud se recibe en términos del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican; por lo tanto, previo a su presentación, el usuario aceptó lo siguiente:

I.- Que el trámite se efectúe, desde su inicio hasta su conclusión, a través de medios de comunicación electrónica;

II.- Bajo protesta de decir verdad, que revisó en la vista previa la información capturada y los anexos a la solicitud y que éstos son correctos; así mismo que, una vez concluido el proceso, no podría editar o variar la información o sus anexos;

III.- Bajo protesta de decir verdad, indicó que la información capturada es cierta;

IV.- Consultar su tablero, al menos, los días quince y último de cada mes, o bien, el día hábil siguiente si alguno de éstos fuere inhábil y que, en caso de no hacerlo, la notificación se tendría por hecha el día hábil siguiente a los días quince y último de cada mes, y

V.- Dar aviso por escrito, a través del correo electrónico buzon@impi.gob.mx, a la Dirección Divisional de Patentes, dentro de los tres días hábiles siguientes a aquel en que se vea imposibilitado, por causas imputables al Instituto, a consultar el tablero o abrir los archivos depositados en el mismo, en los días señalados en la fracción IV anterior.

A efecto de que los documentos presentados a través del Sistema de Patentes en Línea, produzcan los mismos efectos que los documentos firmados autógrafamente y tengan el mismo valor probatorio, manifestó bajo protesta de decir verdad, que los documentos son copia íntegra e inalterada del documento impreso; que se encuentren digitalizados en formato PDF (Portable Document Format), y que los remitió de forma legible.

Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
(55) 53340700 - www.gob.mx/mpi



MX/E/2019/083686

MX/a/2019/014593

Asimismo, desde su registro en el Portal de Acceso a Servicios Electrónicos, manifestó reconocer como propia la CURP, la cual no podrá ser sustituida con posterioridad; reconoció como propia y válida la dirección de correo electrónico proporcionada y aceptó que en ella se le envíe cualquier comunicación relacionada con la cuenta; aceptó que el uso de la contraseña queda bajo su exclusiva responsabilidad y que deberá notificar oportunamente al Instituto, cualquier situación que pudiera implicar un uso indebido; reconoció como propia, veraz y auténtica la información que envíe a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto, ya sea haciendo uso de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; aceptó que el uso de su CURP y contraseña o, en su caso, e-firma, por persona distinta quedará bajo su exclusiva responsabilidad y acepta como propia la información que ésta envíe o descargue a través del PASE o de los servicios electrónicos del Instituto; asumió cualquier tipo de responsabilidad derivada del mal uso que hagan de su CURP y contraseña o, en su caso, su e-firma; y reconoció que el simple uso de los servicios electrónicos del Instituto constituye la aceptación más amplia de las condiciones señaladas en el artículo 11 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de servicios electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

	Cadena Original JAVIER ARIZMENDI SHO 00001000000413547625 Servicio de Administración Tributaria 20380 MX/a/2019/014593 MX/E/2019/083686 04/12/2019 15:26:31 Documento_Firma_Electronica.pdf 19686.89 KB zlb7ISmSOBjGzcrP6Xki+PN2N0=
	Sello Digital L1hbWRCR8h+vQaJgPO9zBfFueUthjvJA7ujf9 0dANYgU86IE3oTsJqDg4UFW9f6+iL1Qs1IFL0f53eEQA4PpyrdqX+QBRebRgRHV0tg3UcvfGpFRj6alh1OT8/znebW83EWYq6uuzhJoMccmvpGIFRkJIghzrnG53X2rzZlea852fAVc2o+29DDV0J88IT8g/uxSd1hThZyPb+prglumZ0iw6d6Jz+E+mPXKyIKOmzpkIE7nE/126VtqKI5tPa1JdvXNy3FAmGhFsmiiDM5WTZ4ImAcMJQjeTc0KYWHGpZ4h10EiWS3HvH7SM403LgeEmRI7bBEETzrmw==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código QR que aparece a un costado de la e-firma del Servidor Público que firmó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1º fracción III, 2º fracciones II y V, 25, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se Establecen los Lineamientos para el uso del Portal de Acceso a Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los Trámites que se Indican; en caso de no contar con lector QR o en su defecto el Código no pueda ser leído por su dispositivo, puede digitar en la página antes referida el siguiente Código :i6RQF28ogbbuE+nLhGVhM3TGCik=

Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México.
(55) 53340700 - www.gob.mx/impi

gob mx
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

REPRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTE ENVIADA A TRAVÉS DEL PORTAL DE ACCESO A SERVICIOS ELECTRÓNICOS (PASE).

Homoclave del formato	Folio
IMPI-00-009	Folio: MX/E/2019/083686

Fecha de publicación en el DOF	Fecha de solicitud del trámite
24 05 2018	04 12 2019

Datos generales de la solicitud

<input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente Normal <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial Especifique cual: <input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	Expediente: MX/a/2019/014593 ID Solicitud: 20380 Fecha: 04/12/2019 03:26:31
--	---

Datos del (de los) solicitante(s)

Personas físicas	Personas morales
CURP:	RFC: INC461125HL8
Nombre(s):	Denominación o razón social: INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA
Primer apellido:	Nacionalidad: MÉXICO
Segundo apellido:	Teléfono (Lada, Número, Extensión): 5556280400, Ext. 22001
Nacionalidad:	Correo electrónico: rsaldanah@incan.edu.mx
Teléfono (Lada, Número, Extensión):	<input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo
Correo electrónico:	<input type="radio"/> Continúa en anexo
<input type="radio"/> Continúa en anexo	

 MÉXICO GOBIERNO DE LA REPÚBLICA				Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/impi
---	---	---	---	---

gob mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
Domicilio del (de los) solicitante(s)	
Código postal: 14080	
Calle: AVENIDA SAN FERNANDO	
Número exterior: 22	Número interior:
Colonia: SECCION XVI	
Municipio o delegación: TLALPAN	Localidad:
Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO	Entre calles:
País: MÉXICO	

Datos del (de los) inventor(es) /diseñador(es)	
CURP: GACA550101HDFRRL03	
Nombre(s): Alejandro Manuel	
Primer apellido: GARCÍA	
Segundo apellido: CARRANCA	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 55566783014	
Correo electrónico: carranca@biomedicas.unam.mx	 Continúa en anexo

Domicilio del (de los) inventor(es)/diseñador(es)	
Código postal: 10630	
Calle: TOCHIHUEHUE	
Número exterior: 51	Número interior: 7
Colonia: EL OCOTAL	
Municipio o delegación: LA MAGDALENA CONTRERAS	Localidad:
Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO	Entre calles:
País: MÉXICO	

   	Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 533440700 www.gob.mx/impi
---	--

gob mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
Datos del (de los) apoderado(s)	
CURP: GACA550101HDFRRL03	RGP:
Nombre(s): Alejandro Manuel	Personas autorizadas para oír/recibir notificaciones: Sara Ofélia MATA MORALES
Primer apellido: GARCIA	
Segundo apellido: CARRANCA	
Nacionalidad: MÉXICO	
Teléfono (Lada, Número, Extensión): 5555086910	
Correo electrónico: carranca@biomedicas.unam.mx	Continúa en anexo


Domicilio del (de los) apoderado(s)	
Código postal: 14080	
Calle: AV. SAN FERNANDO	
Número exterior: 22	Número interior:
Colonia: SECCIÓN XVI	
Municipio o delegación: TLALPAN	Localidad:
Estado o entidad federativa: CIUDAD DE MEXICO	Entre calles:
País: MÉXICO	

Datos de la Solicitud
Denominación o título de la invención: CDH1 Y SNAI1 COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE UN CÁNCER CON POTENCIAL METASTÁSICO ASOCIADO A VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
Fecha divulgación previa: 09/07/2019

Divisional de la solicitud
Fecha presentación:
Número:
Figura jurídica:

Prioridad Reclamada		
País:	Fecha de Presentación:	Número de Serie:

   	Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/mpi
---	--


Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
Observaciones

Bajo protesta de decir verdad, el firmante manifiesta que los datos asentados en esta solicitud son ciertos y que en caso de actuar como mandatario, cuenta con facultades para llevar a cabo el presente trámite.



Cadena Original

ALEJANDRO MANUEL GARCIA CARRANCA|CURP|GACA550101HDFRRL03|RENAPO|04/12/2019 15:26:23|1053690|71|Documento_Firma_Electronica.pdf|9589.81 KB|zlb7iSmSOBgzcrP6Xk+PNZN0=|000020380|PATENTE|Normal|CDH1 Y SNAI1 COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNOSTICO, PRONOSTICO Y TRATAMIENTO DE UN CANCER CON POTENCIAL METASTÁSICO ASOCIADO A VIRUS DE PAPILOMA HUMANO|INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA| MORAL|Alejandro Manuel GARCIA CARRANCA|Alejandro Manuel GARCIA CARRANCA|GACA550101HDFRRL03|

Sello Digital

8qCKak3mK1XmV48D1ggont7mkvSNPLUXz1FyGyJR3J0=

Anexo(s)

Hoja anexa a la solicitud ID: 20380	De Fecha: 04/12/2019 03:26:31
-------------------------------------	-------------------------------

Lista de Solicitantes

Solicitante 2
- Causahabiente
- Nombre: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
- RFC:
- Nacionalidad: ESPAÑA
- Domicilio: Calle EINSTEIN, Ext. 3, Col. CIUDAD UNIVERSITARIA, C. P. 28049, Tel. 34914977437, E-mail ana.mendez@fuam.uam.es
- Población, Estado y País: MADRID, MADRID, ESPAÑA

Lista Inventores/Diseñadores

Inventor/Diseñador 2
- Nombre: Pedro ROSENDO CHALMA
- CURP: ROCP830409HGRSHD05
- Nacionalidad: MÉXICO
- Domicilio: Calle AVENIDA JARDIN, Ext. 10, Col. TLATILCO, C. P. 02860, Tel. 5531815835, E-mail peterchalma@hotmail.com
- Población, Estado y País: AZCAPOTZALCO, CIUDAD DE MEXICO, MÉXICO
Inventor/Diseñador 3
- Nombre: Amparo CANO GARCÍA
- CURP: DNI: 74306952R
- Nacionalidad: ESPAÑA
- Domicilio: Calle VILLA DE MARÍN, Ext. 37, C. P. 28029, Tel. 34914975400, E-mail acano@iib.uam.es

				Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/imp
---	---	---	---	--

gob mx	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
- Población, Estado y País: MADRID, MADRID, ESPAÑA	
Inventor/Diseñador 4	
- Nombre: Verónica ANTONIO VÉJAR	
- CURP: AOVV740128MGRNJR09	
- Nacionalidad: MÉXICO	
- Domicilio: Calle PRESA INFIERNILLO, Ext. 32, Int. 8, Col. AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO, C. P. 39070, Tel. 7471413787, E-mail vvejar@gmail.com	
- Población, Estado y País: CHILPANCINGO DE LOS BRAVO, GUERRERO, MÉXICO	
Inventor/Diseñador 5	
- Nombre: Gabriele Davide BIGONI ORDÓÑEZ	
- CURP: BIOG830830HNEGRB01	
- Nacionalidad: ITALIA	
- Domicilio: Calle AMÉRICO VESPUCCIO Y PUESTO DE PALOS, Ext. S/N, Col. PARROQUIA YANUCÁY, C. P. 010114, Tel. 3968518891, E-mail gabrieleb@hotmail.it	
- Población, Estado y País: CUENCA, CUENCA, ECUADOR	
Inventor/Diseñador 6	
- Nombre: Carlos César PATIÑO MORALES	
- CURP: PAMC881016HGRTRR06	
- Nacionalidad: MÉXICO	
- Domicilio: Calle LAGO ONEGA, Ext. 102, Col. AHUEHUETES ANÁHUAC, C. P. 11450, Tel. 5545550315, E-mail carlosesar@gmail.com	
- Población, Estado y País: MIGUEL HIDALGO, CIUDAD DE MEXICO, MÉXICO	
Inventor/Diseñador 7	
- Nombre: Rocio Susana MÉNDEZ MARTÍNEZ	
- CURP: MEMR670530MDFNRC04	
- Nacionalidad: MÉXICO	
- Domicilio: Calle COMPOSTELA, Ext. 126, Col. BELLA VISTA IZTAPALAPA, C. P. 09860, Tel. 5529636767, E-mail rocmemmar@yahoo.com	
- Población, Estado y País: IZTAPALAPA, CIUDAD DE MEXICO, MÉXICO	

Lista Apoderados	
Apoderado 2	
- Nombre: Rocio SALDAÑA HERNÁNDEZ	
- CURP: SAHR730506MDFLRC00	
- RGP: 38932	

   	Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/mpi
---	--

MX/ai/2019/014593

gob mx
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
Número de Páginas Manifestadas

- Número de Páginas: 38

 MÉXICO GOBIERNO DE LA ESPAÑA				 IMPI INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL	Contacto: Arenal #550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, 16020, Ciudad de México. Teléfono: (55) 53340700 www.gob.mx/imp
--	---	---	---	--	--

Página 6 de 6

**CDH1 Y SNAI1 COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO
Y TRATAMIENTO DE UN CÁNCER CON POTENCIAL METASTÁSICO ASOCIADO
A VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención tiene su aplicación dentro del área de la salud, específicamente dentro del campo de la biomedicina molecular del cáncer, y trata sobre la determinación del nivel de expresión de *CDH1* y *SNAI1*, y la determinación del estado y/o patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* como: (i) biomarcadores para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (ii) para pronosticar la susceptibilidad de desarrollar metástasis en un sujeto que tiene una lesión neoplásica o un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (iii) biomarcadores para diagnosticar que un tumor asociado virus oncogénico tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal o un fenotipo invasivo, y/o como (iv) biomarcadores para el empleo de agentes terapéuticos de regulación epigenética, tales como agentes que inhiben a DNA metiltransferasas y/o agentes que inhiben a desacetilasas de histonas, en el tratamiento de un cáncer con potencial metastásico asociado a virus oncogénico, en donde el virus oncogénico es el Virus de Papiloma humano (VPH).

APOYOS ECONÓMICOS

Esta invención deriva del proyecto de tesis doctoral del M. en C. Pedro Rosendo Chalma, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y quien recibió la beca con número de CVU/becario: 210614/203376 del CONACyT y beca del Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP)-UNAM durante su estancia doctoral en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Esta invención fue realizada en el Laboratorio de Virus y Cáncer de la Unidad de Investigación Básica en

25 Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología-SSA, y contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, N° 253804) y Fundación Miguel Alemán para el Dr. Alejandro M. García Carrancá.

Durante la estancia doctoral de PR-C en el laboratorio B-16 de la Dra. Amparo Cano García, con sede en la Universidad Autónoma de Madrid, este proyecto contó con el apoyo de MINECO (No. SAF2013-30 44739-R para Dra. Amparo Cano García).

ANTECEDENTES

Según los datos publicados y las estimaciones actuales, del 15% al 20% de todos los casos de cánceres que afectan a hombres y a mujeres se pueden atribuir a agentes infecciosos, incluidos

35 *Helicobacter pylori* y virus del papiloma humano (VPH), seguidos de los virus de la hepatitis B (VHB),

virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de Epstein-Barr (VEB) [1-3]. Además, el VPH, específicamente los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59 (comúnmente referidos como de alto riesgo), no solo están asociados con el cáncer cervical, que fue reportado como el tercer tipo de cáncer más prevalente en todo el mundo en mujeres en el 2017, sino también están asociados con otros tipos de cánceres, como el anal, el de pene, de vulva, de vagina y de cabeza y el cuello [1, 4].

Las infecciones persistentes con virus de papiloma humano de alto riesgo (VPHs-AR) son necesarias, pero no suficientes para causar cáncer, lo que indica la existencia de acciones de múltiples etapas en la carcinogénesis del cuello uterino que contribuyen a las características distintivas que subyacen en el fenotipo de los tumores [3, 5]. Por esta razón, ha sido de gran interés estudiar los mecanismos por los cuales las infecciones persistentes con VPHs-AR contribuyen al desarrollo del cáncer. Por otro lado, se ha demostrado que el VPH induce una serie de mecanismos que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune y a la muerte celular activada por apoptosis, que finalmente dan lugar a la transformación, proliferación e inmortalización de la célula huésped [6, 7].

En particular, durante el proceso carcinogénico del cáncer de cuello uterino (CaCU), se ha demostrado que la interrupción de la infección productiva por VPH o la interrupción del ciclo de vida del VPH debido al fenómeno de integración del genoma viral en el genoma celular [8, 9] y la activación de la maquinaria de metilación celular están involucrados en el proceso carcinogénico del CaCU [10-12]. Específicamente, se ha reportado que la oncoproteína E7 de los VPHs-AR desempeña un papel crucial en la transformación oncogénica, debido a su capacidad para formar complejos con miembros de la familia de la proteína del retinoblastoma (pRB) y desestabilizarlos [13, 14], además de su capacidad de interactuar con otras proteínas, que incluyen a la desacetilasa de histona 1 (HDAC1) y a la DNA metiltransferasa 1 (Dnmt1); en donde la formación del complejo E7-VPH/HDAC1 es necesario para el mantenimiento de los episomas virales, para controlar la proliferación celular y extender la vida de la célula infectada [15], y en donde el complejo E7-VPH/Dnmt1 estimula la actividad metiltransferasa de Dnmt1 conduciendo así a una metilación aberrante del genoma y transformación celular como consecuencia del silenciamiento de genes supresores de tumor [16].

Se ha observado que una característica común de varios tipos de cáncer asociados con virus es la disminución de la expresión del gen *CDH1*, que codifica para E-cadherina, a través de mecanismos epigenéticos [17-19], en donde las oncoproteínas virales juegan un papel importante regulando la expresión de *CDH1*; por ejemplo, se conoce en el estado de la técnica que la proteína X del VHB (HBx) [17], la proteína core del VHC [20] y la proteína 1 latente de membrana (LMP1) del VEB [19] reducen o suprimen la expresión de *CDH1* vía metilación de la región promotora de *CDH1*.

Por otro lado, para el caso de los cánceres asociados con infecciones por VPH, se tiene que el documento más cercano al estado de la técnica es lo divulgado por *Laurson, et al.*, quien reportó en un modelo de células NIKS, que se derivan de queratinocitos de prepucio, y que fueron transfectadas ya sea

con la región codificante para E7 de VPH16 (denominadas NIKS+E7) o con el DNA episomal de VPH16 (denominadas NIKS+VPH16), de que E7 suprime la transcripción del gen *CDH1*, reduciendo así la expresión de la proteína E-cadherina; sin embargo, en dicho documento se observó que no hubo diferencias en el estado de metilación de los sitios CpGs de la región promotora del gen *CDH1* tanto en las células NIKS no infectadas con VPH16 (denominadas como NIKS o células control) como en las NIKS+VPH16, ya que todos los sitios CpGs en la región promotora de *CDH1*, tanto en las células NIKS como en las células NIKS+VPH16, estaban desmetilados. Por lo que en dicho documento concluyeron que, si bien E7 de VPH induce la expresión de Dnmt1, no pudo asociarse que VPH16 o la oncoproteína E7 pudieran inducir el silenciamiento de *CDH1* por metilación, esto debido a que el promotor de *CDH1* permaneció sin metilar, estuviera presente o no VPH en las células NIKS. Además, a pesar de que *SNAI2* (*SLUG*) fue considerado como el candidato para ser mediador de la expresión de *CDH1*, se observó que ni el nivel de expresión de *SNAI2* ni su localización fueron alterados por E7, por lo que se sugirió que VPH puede modular la expresión de genes celulares sin causar cambios epigenéticos en el genoma de la célula huésped [21].

Hasta este punto, es evidente que el VPH activa la maquinaria de metilación a través del complejo E7/Dnmt1; sin embargo, en base a lo divulgado en el estado de la técnica, no es claro cómo el VPH induce la represión de *CDH1* por mecanismos epigenéticos que pudieran dar lugar al proceso de transición epitelio mesénquima (TEM) con la subsecuente progresión de metástasis de las células tumorales.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra el estado de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en diferentes líneas celulares. En (A) se muestra la ubicación de diferentes elementos tales como motivos E-box y GC-box que regulan la transcripción en la región promotora del gen *CDH1*, las líneas verticales indican cada sitio CpG contenido en la región promotora. En (B) se muestra un diagrama de metilación tipo lollipop de secuenciación de la región promotora de *CDH1* en líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski que derivan de diferentes tipos de cáncer de cuello uterino y que son positivas a VPH-AR; y de HaCaT, que es una línea celular no tumorigénica de queratinocitos humanos inmortalizados; así como de un control negativo a metilación, DNA de linfocitos humanos (DNA no metilado); y de un control positivo a metilación, DNA de linfocitos humanos tratados con la metilasa M.SssI (DNA metilado). Un círculo negro indica una CpG metilada y un círculo blanco indica una CpG no metilada. En (C) se muestra la cuantificación de la frecuencia de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares HeLa, SiHa y Ca Ski.

Figura 2. Muestra la expresión a nivel de mRNA y proteína de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y HaCaT. En (A) se muestra el nivel de expresión del mRNA de los genes *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en las líneas celulares indicadas. El valor relativo se obtuvo utilizando una

35

muestra de RNA total de cérvix humano obtenido de la compañía Ambion® (No. Cat. AM6992) como control. Los valores de *P<0.05, **P<0.01 son en relación con la línea celular HaCaT. En (B) se muestra la expresión de proteínas de E-cadherina, Snai1 y Snai2 evaluadas por Western blot en las líneas celulares antes indicadas. GAPDH se utilizó como control de carga.

5 **Figura 3.** Muestra los cambios en el patrón de metilación del promotor de *CDH1* en líneas celulares HeLa y SiHa después del tratamiento con 5-AzadC y TSA. Diagramas de metilación tipo lollipop que muestran cambios en el patrón de metilación en los sitios CpG de la región promotora de *CDH1* en las líneas celulares (A) HeLa y (C) SiHa después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA en comparación con las células no tratadas (NT) y tratadas con vehículo. Un círculo negro indica una CpG metilada y un círculo blanco indica una CpG no metilada. Cuantificación de la frecuencia de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares (B) HeLa y (D) SiHa después del tratamiento con las concentraciones indicadas de 5-AzadC y TSA en comparación con las células NT. *P<0.05, **P<0.01 frente a células no tratadas (NT).

15 **Figura 4.** Muestra los cambios en los niveles de expresión de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en células HeLa y SiHa después del tratamiento con 5-AzadC y TSA. Graficas de qPCR que muestran los niveles de expresión de mRNA de *CDH1*, *SNAI1* y *SNAI2* en (A-C) HeLa y (D-F) SiHa después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA en comparación con las células no tratadas (NT); *P<0.05, **P<0.01 frente a células no tratadas (NT). Expresión proteica de E-cadherina en las líneas celulares (G) HeLa y (H) SiHa. Expresión proteica de Snai1 en las líneas celulares (I) HeLa y (J) SiHa después de los tratamientos indicados.

20 **Figura 5.** Muestra que el silenciamiento de E7 de VPH18 y HPV16 modifica el patrón de metilación del promotor *CDH1* en las líneas celulares HeLa y SiHa. Diagramas de metilación tipo lollipop que muestran cambios en el patrón de metilación en sitios CpG de la región promotora de *CDH1* en las líneas celulares (A) HeLa y (C) SiHa después de la transfección con siRNAs dirigidos contra E7 y GAPDH en comparación con células de control sin transfectar (NT) y control de vehículo. Un círculo negro indica una CpG metilada y un círculo blanco indica una CpG no metilada. Frecuencia de metilación del promotor de *CDH1* en células (B) HeLa y (D) SiHa después de la transfección con siRNA dirigido contra E7 de VPH18, E7 de VPH16 y GAPDH en comparación con células no transfectadas (NT).

25 **Figura 6.** Muestra que el silenciamiento de E7 de VPH18 y VPH16 modifica la expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en líneas celulares HeLa y SiHa. En (A-E) se muestran los niveles relativos de expresión de mRNA de *E7*, *CDH1*, *GAPDH*, *SNAI1* y *SNAI2* en líneas celulares HeLa y SiHa después de la transfección con siRNAs contra E7 y GAPDH. *P <0.05, **P<0.01 frente a células no transfectadas (NT). Expresión proteica de E-cadherina, Snai1, GAPDH y β-actina en las líneas celulares (F y H) HeLa y (G e I) SiHa después de la transfección con siRNAs dirigidos contra E7 y GAPDH.

Figura 7. Muestra una qPCR en donde se midieron los niveles de expresión a nivel de mRNA de los genes *CDH1*, *SNAI1*, *GAPDH* y β -*ACTINA* en las líneas celulares HaCaT, HeLa, SiHa y Ca Ski. Una muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) se utilizó como referencia para obtener los valores relativos. Los valores de ΔCt de cada gen se normalizaron con el gen de referencia β -*ACTINA* utilizando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Figura 8. Muestra un modelo esquemático que demuestra cómo E7 de VPH-AR puede inducir la TEM a través de Snai1. (A) Esquematiza a proteínas cuya expresión es inducida por o interactúa con E7. La pérdida de la función de E2, ya sea por el fenómeno de integración o por la metilación de los sitios de unión a E2 en la región larga de control (LCR) del VPH, da a lugar a la expresión desregulada de las oncoproteínas E6 y E7. La oncoproteína E7 desempeña un papel importante en la regulación de varias vías; E7 induce la proliferación celular a través de pRB, y E7 no solo induce la expresión de Dnmt1 y HDAC1, sino que también interactúa físicamente con ellos, lo que promueve la regulación epigenética de sus propios genes virales y de los genes celulares. Los hallazgos presentados en esta invención indican que E7 no solo suprime la expresión de *CDH1* a través de la metilación de su región promotora, sino que también induce la expresión de Snai1, que es un regulador negativo de la expresión de *CDH1*. En (B y C) se ilustran modelos propuestos de cómo E7 podría regular la expresión de *CDH1*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS), y en México, el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y las Instituciones que conforman el Sistema Nacional de Salud, reportan que a la fecha los métodos de diagnóstico de infección por VPH empleados son: Papanicolaou, citología, colposcopia y la inspección visual con ácido acético, las cuales son pruebas para la detección de anomalías celulares (neoplasias) y lesiones visibles causadas por la infección por VPH, así también, se emplean las pruebas moleculares tales como PCR (usando los oligonucleótidos MY09/11 y GP5+/6+), PCR-RFLPs, INNO-LiPA®, captura de híbridos II (HC2) y COBAS 4800 para la detección y genotipificación de VPH [22-25].

Por otro lado, los tratamientos reportados por dichas instancias incluyen la crioterapia, escisión electroquirúrgica con asa (LEEP), conización cervical e histerectomía de tipos I a V que dependerán de la etapa clínica de la lesión (estadificación según FIGO), en donde dichos tratamientos son meramente quirúrgicos, que involucran una pérdida de la capacidad reproductiva de la mujer; en donde, la traquelectomía radical, solo es reservada para pacientes con deseos de conservar su capacidad reproductiva pero que presenten un diagnóstico de tumores centrales menores a 2 cm, con histología epidermoide y sin penetración linfática. La radioterapia y quimioterapia son utilizadas como tratamiento adyuvante postoperatorio [22-25].

Dichos métodos de diagnóstico empleados en el estado de la técnica solo brindan información sobre el tipo viral que originó a la lesión neoplásica, más no brinda información adicional que indique al médico si dicha lesión neoplásica progresará a un cáncer, o en su defecto, si dicho cáncer desarrollará metástasis. Por otro lado, los tratamientos empleados en el estado de la técnica son quirúrgicos y radicales, que muchas veces ocasionan pérdida de la capacidad reproductiva de mujeres en etapa fértil. En este sentido, el problema técnico que enfrentan los especialistas en la salud, es poder realizar un diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento oportuno de forma temprana, con bajo costo y con un proceso menos invasivo para el paciente que posee una lesión neoplásica y/o un cáncer con probable potencial metastásico o susceptibilidad para desarrollar metástasis.

Como solución a dichos problemas técnicos, en esta invención se proponen técnicas moleculares que incluyen: la determinación de la expresión de *CDH1* y *SNAI1* como biomarcadores de susceptibilidad para desarrollar metástasis, en donde se comprobó que E7 de VPH no solo suprime la expresión de *CDH1* a través de la metilación de la región promotora de dicho gen, sino que también E7 regula la expresión de *SNAI1*, el cual es un regulador negativo de *CDH1* que está asociado con metástasis al participar en la transición epitelio-mesénquima (TEM) [26-29], en donde el proceso de TEM es usado por las células tumorales para escapar del entorno de alta presión que se encuentra en el tumor primario y extenderse hacia la metástasis de los tejidos distantes [30, 31].

Es conocido en el estado de la técnica que la TEM se produce no solo durante el desarrollo embrionario normal, sino que también se produce en situaciones patológicas como la adquisición del fenotipo invasivo en tumores epiteliales (fenotipo mesenquimal), en el que constituye el primer paso para la formación de metástasis. Esta TEM patológica se ha asociado con una regulación a la baja de la expresión de *CDH1* y a la adquisición de propiedades migratorias. En donde la pérdida de la expresión de *CDH1* es crucial para la progresión del adenoma al carcinoma [32], y en donde además se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de *SNAI1* y *CDH1* en líneas celulares humanas y de ratón [26, 33, 34].

De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar que un tumor asociado a VPH presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal, en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer procedente de un sujeto, y en donde dicho método comprende:

- (1) Determinar el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra de tumor procedente de un sujeto,
- (2) Determinar el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* en la muestra de tumor procedente de dicho sujeto,
- (3) Comparar el nivel de expresión obtenido en (1) con el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra control, y

(4) Comparar el estado y/o patrón de metilación obtenido en (2) con el estado y/o patrón de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en una muestra control.

En donde, si en la muestra de tumor: (i) la expresión de *CDH1* es baja o nula en comparación con un valor de referencia de una muestra control, (ii) si *SNAI1* está sobre-expresado en comparación con un valor de referencia de una muestra control, y (iii) si la región promotora del gen *CDH1* esta hipometilada o hipermetilada en comparación con un valor de referencia de una muestra control, entonces el tumor en dicho sujeto tiene potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con un cáncer asociado a VPH, y/o para pronosticar la susceptibilidad de desarrollar metástasis en un sujeto con una lesión neoplásica o cáncer asociado a VPH, en donde dichos métodos comprenden:

- (1) Determinar el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra de una lesión neoplásica o cáncer asociado a VPH obtenida de dicho sujeto,
- (2) Determinar el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* en la muestra de dicho sujeto,
- (3) Comparar el nivel de expresión obtenido en (1) con el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra control, y
- (4) Comparar el estado y/o patrón de metilación obtenido en (2) con el estado y/o patrón de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en una muestra control.

En donde, si en la muestra de dicho sujeto: (i) la expresión de *CDH1* es baja o nula en comparación con un valor de referencia de una muestra control, (ii) si *SNAI1* está sobre-expresado en comparación con un valor de referencia de una muestra control, y (iii) si la región promotora del gen *CDH1* esta hipometilada o hipermetilada en comparación con un valor de referencia de una muestra control, entonces el sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis, o una mayor susceptibilidad de desarrollar metástasis.

En donde para efectos de esta invención, una "*lesión neoplásica asociada a VPH*" se define como una masa de células anormales de un tejido (tumor) o un área de tejido anormal causada por la infección con VPH, en donde dicha lesión neoplásica comprende, más no está limitada a una hiperplasia, hipertrofia, metaplasia o displasia.

En otro aspecto, el "*cáncer asociado a VPH*" se define como un tumor de células malignas transformadas por VPH originado en epitelio de cuello uterino, orofaringe, ano, recto, pene, vagina y vulva, también denominado como "*carcinoma de células escamosas*"; o un tumor de células malignas transformadas por VPH originado en glándulas del cuello uterino, denominada también como "*adenocarcinoma*".

En otro aspecto y para efectos prácticos de esta invención, la *“lesión neoplásica asociada a VPH”* y el *“cáncer asociado a VPH”* también se pueden definir como un *“tumor asociado a VPH”* o *“tumor de células malignas transformadas por VPH”*.

5 En donde, la *“lesión neoplásica asociada a VPH”* o el *“cáncer asociado a VPH”* tiene su origen en epitelio simple o en epitelio estratificado de cuello uterino, de región anal, de pene, vulva, vagina y/o cabeza y cuello, preferentemente en cuello uterino.

En donde para efectos de esta invención, *“una célula con potencial metastásico”* o *“una célula con fenotipo mesenquimal”* o *“una célula con fenotipo invasivo”* se define como células procedentes de una lesión neoplásica o de un cáncer asociado a VPH, caracterizadas porque presentan una expresión baja o nula de CDH1, sobre-expresión de SNAI1, e hipometilación o hipermetilación en la región promotora del gen *CDH1*.
10

En otro aspecto, y para efectos prácticos de esta invención *“un tumor con potencial metastásico”* o *“un tumor con fenotipo mesenquimal”* o *“un tumor con fenotipo invasivo”* se define como una masa de células malignas transformadas por VPH caracterizadas porque presentan una expresión baja o nula de CDH1, sobre-expresión de SNAI1, e hipometilación o hipermetilación en la región promotora del gen *CDH1*.
15

En una realización, la *“muestra de un sujeto”* de acuerdo con esta invención, comprende, más no está limitada a: células obtenidas por raspado, citología líquida o biopsia de una lesión neoplásica o de un cáncer asociado a VPH.

20 En donde, la *“muestra de un sujeto”* comprende: ácidos nucleicos tales como RNA o DNA, o un extracto de proteínas totales procedentes de células obtenidas por raspado o por citología líquida de una lesión neoplásica o de una biopsia de cáncer asociado a VPH.

En otro aspecto, la *“muestra control”* de acuerdo con esta invención, comprende, más no está limitada a: células de citología normal negativas a VPH, o a una línea celular epidérmica humana
25 inmortalizada no tumorigénica derivada de queratinocitos de la piel (células HaCaT) negativa a VPH, o una muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH (Human Cervix Total RNA, no. de cat. AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

Adicionalmente, en la presente invención se describe un método para tratar un tumor asociado a VPH que previamente ha sido identificado como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo
30 mesenquimal; en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer, y en donde el método comprende administrar un inhibidor de DNA metiltransferasas, en donde el inhibidor de DNA metiltransferasas comprende, más no está limitado a: 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AzadC, también denominado como Decitabina o Dacogen®), Azacitidina (Vidaza®), y/o Guadecitabina (SGI-110), preferentemente 5-AzadC (Decitabina); y en donde para efectos de esta invención, *“un inhibidor de DNA*
35 *metiltransferasas”* se define como un agente que inhibe la actividad de las DNA metiltransferasas

(DNMTs), causando la desmetilación o hemi-desmetilación del DNA y dando como resultado la activación o restauración de la expresión de genes silenciados por metilación del DNA, en este caso, el inhibidor de DNA metiltransferasas promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al inducir la restauración de la expresión de CDH1.

- 5 También se describe en la presente invención, un método para tratar un tumor asociado a VPH que previamente ha sido identificado como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer, y en donde el método comprende administrar un inhibidor de desacetilasas de histonas, en donde el inhibidor de desacetilasas de histonas comprende, más no está limitado a: Trichostatina A (TSA o UNII-3X2S926L3Z), Vorinostat (Zolinza®),
10 Belinostat (Beleodaq®), Romidepsin (Istodax®), Panobinostat (Farydak®) y/o Chidamide (CS055/Tucidinostat/Epza), preferentemente TSA (UNII-3X2S926L3Z); y en donde para efectos de esta invención, “un inhibidor de desacetilasas de histonas” se define como un agente que inhibe a las desacetilasas de histonas (HDACs), dando como resultado la hiperacetilación de las histonas centrales que modulan la estructura de la cromatina, en donde un aumento en la acetilación de histonas promueve la
15 transcripción selectiva de genes y la inhibición del crecimiento tumoral, en este caso, el inhibidor de desacetilasas de histonas promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al inducir la restauración de la expresión de CDH1.

- Por último, se describe en la presente invención, un método para tratar células malignas de tumor transformadas por VPH que previamente ha sido identificado como que tiene un potencial metastásico o
20 un fenotipo mesenquimal; en donde el método comprende administrar un siRNA seleccionado de: un siRNA dirigido contra E7 de VPH16 (cat. no. 4399665, ID: s237642, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) o un siRNA dirigido contra E7 de VPH18 (cat. no. 4399665, ID: s237640; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.), en donde el siRNA dirigido contra E7 de VPH promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al promover la restauración de la expresión de CDH1 e inducir una supresión
25 en la expresión de SNAI1.

Metodologías utilizadas durante el desarrollo de esta invención.

En esta invención se emplearon las siguientes metodologías:

- 1) Para la determinación del nivel de expresión de los genes *CDH1 (E-Cadherina)*, *SNAI1*, *SNAI2*,
30 *E7 de VPH 16 y 18*, *GAPDH*, *HPRT* y β -*ACTINA* a nivel de mRNA.

Extracción de RNA total. El RNA total de las diferentes líneas celulares se extrajo utilizando TRIzol® Reagent (no. de cat. 15596026; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.)

Purificación del RNA total. Posteriormente, el RNA total se trató con *DNase I* (no. de cat. EN0521; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y se purificó con Direct-zol™ RNA MicroPrep (no. de cat.

10

R2060; Zymo Research Corp.) de acuerdo con el protocolo del fabricante, esto con la finalidad de eliminar el DNA genómico residual y limpiar las reacciones enzimáticas que pudieran estar presentes en el RNA.

5 **Retrotranscripción.** El DNA complementario (cDNA) se obtuvo a partir del RNA purificado utilizando el kit de SuperScript™ IV First-Strand Syntesis (no. de cat. 18091050; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) según las especificaciones del fabricante.

10 **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** La determinación de la expresión génica a nivel de mRNA puede realizarse a través de métodos conocidos en el estado de la técnica; por ejemplo, por PCR en punto final posterior a la retrotranscripción (RT-PCR) o por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Para efectos de esta invención, se sometieron a qPCR 60 ng del cDNA para determinar los niveles de expresión de los genes de interés utilizando los cebadores enumerados en la Tabla I.

Tabla I. Secuencia de los oligonucleótidos usados para los ensayos de BSP y qPCR en diferentes blancos genéticos.

Nombre del gen	Tipo de ensayo	Secuencia de los oligonucleótidos (5'→3')
CDH1	BSP	Forward TTTTAGTAATTTAGGTTAGAGGGTAT Reverse AAACTCACAAATACTTTACAATTCC
CDH1	qPCR	Forward GTCAGTTCAGACTCCAGCCC Reverse AAATCACTCTGCCAGGACG
SNAI1	qPCR	Forward ACCACTATGCCGCGCTCTT Reverse GGTCGTAGGGTGCTGGAA
SNAI2	qPCR	Forward GACCCTGGTTGCTTCAAGGA Reverse TGTTCAGTGAGGGCAAGAA
E7 de VPH16	qPCR	Forward CAGCTCAGAGGAGGAGGATG Reverse TGCCATTAACAGGTCTTC
E7 de VPH18	qPCR	Forward TGAATTCGCGTTGACCTTC Reverse CACGGACACAAAGGACAG
GAPDH	qPCR	Forward AAGGTCGGAGTCAACGGATTG Reverse CCATGGGTGGAATCATATTGGAA
HPRT	qPCR	Forward GGACTAATTATGGACAGGACTG Reverse GCTCTCAGTCGATAAAATCTAC
B-ACTINA	qPCR	Forward CTGGAACGGTGAAGGTGACA Reverse AAGGACTTCCTGTAACAATGCA

PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio (BSP), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

15 Las condiciones de la qPCR utilizadas incluyeron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 10 minutos, 40 ciclos de tres pasos de 95 °C durante 20 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 35 segundos, y un paso final de extensión a 72 °C durante 7 minutos, seguido de un análisis de curva de fusión de 65-95 °C. Todos los ensayos de la qPCR se procesaron por triplicado y se analizaron en el equipo Rotor-Gene Q Series (Qiagen, Inc.).

2) **Para la determinación del nivel de expresión de E-cadherina (CDH1), Snai1, Snai2, GAPDH y β -actina a nivel de proteína.**

En donde la medición del nivel de expresión proteica puede realizarse por técnicas tales como: Western blot, citometría de flujo o por inmunohistoquímica. En donde para efectos de esta invención se realizó la siguiente metodología:

Extracción de proteínas totales. Las proteínas totales se obtuvieron utilizando un buffer de lisis, que consiste en: 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 5 mM de Tris-HCl a pH 9.0, 1% de Nonidet-P40 y 1.2 mg/mL del cóctel inhibidor de proteasas cOmplet™ (Roche Applied Science). Los extractos de proteína fueron forzados a través de una aguja de calibre 22 diez veces y se centrifugaron durante 10 minutos a 17,000 x g a 4 °C. La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford.

Western blot (WB). Se cargaron 30 mg de proteína y se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12%, seguido de transferencia en membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó por una hora con una solución que contenía 5% de leche en polvo sin grasa diluida en TBS 1x con 0.1% de Tween-20 (TBST) a temperatura ambiente con agitación suave. Las membranas fueron incubadas toda la noche en TBST con 5% de leche en polvo sin grasa con las diluciones de anticuerpos contra: E-cadherina (no. de cat. Sc-8426; 1: 1,000), GAPDH (no. de cat. Sc-48167; 1: 1,000) y β -actina (no. de cat. Sc-1616; 1: 1,000) que fueron adquiridas en Santa Cruz Biotechnology, Inc. Para el caso de los anticuerpos contra Snai1 (no. de cat. L70G2; 1: 1,000) y Snai2 (no. de cat. C19G7; 1: 1,000) adquiridas de Cell Signaling Technology, Inc., las membranas fueron incubadas durante toda la noche con las diluciones de anticuerpo en TBST con 5% de BSA.

Los anticuerpos secundarios goat anti-mouse IgG-HRP (no. de cat. sc-2005; 1:10,000) y donkey anti-rabbit IgG-HRP (no. de cat. sc-2313; 1:10,000) y donkey anti-goat IgG-HRP (no. de cat. sc-2020; 1: 5,000) adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc., fueron diluidos en TBST con 5% de leche en polvo sin grasa e incubados durante dos horas a temperatura ambiente. Se utilizó el sustrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP (EMD Millipore) para la detección de proteínas y la inmunodetección fue realizada con el equipo de escáner C-DiGit Blot (Li-Cor Biosciences) y procesada en el software Image Studio™ Lite v5.2 (Li-Cor Biosciences).

3) **Para la determinación del patrón de metilación de la región promotora de CDH1.**

El patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* puede determinarse por diferentes metodologías conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo: PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio (BSP, bisulfite sequencing PCR), por PCR específica para metilación (MSP, methylation specific PCR) o por fusión de alta resolución sensible a la metilación

(MS-HRM, methylation-sensitive high resolution melting). En donde para efectos de esta invención se realizó la siguiente metodología:

Extracción de DNA genómico. El DNA genómico de las diferentes líneas celulares se aisló utilizando el kit de purificación de DNA genómico The Wizard®.

5 **Generación de controles positivos y negativos de metilación del DNA.** Se empleó el DNA genómico obtenido de linfocitos humanos como control negativo de metilación (DNA no metilado). Como control positivo de metilación (DNA metilado) se empleó DNA genómico de linfocitos humanos tratados de acuerdo con el protocolo del fabricante para la CpG metilasa M.SssI (cat. no. E2011; Zymo Research Corp.).

10 **Modificación del DNA genómico con bisulfito de sodio.** Se trataron 1.5 µg del DNA genómico con bisulfito de sodio de acuerdo con el protocolo del fabricante del kit EZ DNA Methylation-Gold™ (no. de cat. D5006; Zymo Research Corp.).

15 **Diseño de oligonucleótidos para determinar el patrón de metilación.** La metilación de los sitios CpGs en la región promotora de *CDH1* se analizó mediante el protocolo BSP (Bisulfite Sequencing PCR, PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio). Los oligonucleótidos para BSP (ver secuencias en Tabla I) fueron diseñados utilizando el software MethPrimer v2.0 (The Li Lab; PUMCH; Chinese Academy of Medical Sciences) utilizando la secuencia de GenBank con código de acceso DQ335132.1 para el gen *CDH1*.

20 **PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio (BSP).** Se realizó una reacción de PCR con un volumen total de 25 µL, que contenía 1x del PCR Gold Buffer, 1 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 10 pMol de cada oligonucleótido para BSP (secuencias en Tabla I), y 1 unidad de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (no. de cat. 4338856; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.), y 300 ng del DNA modificado con bisulfito. Las condiciones de corrimiento de la PCR fueron: 95 °C durante 7 min, seguido de 35 ciclos (a 95 °C durante 35 segundos, 57 °C durante 35 segundos y 72 °C durante 60 segundos), con una etapa final de extensión de 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR se purificaron utilizando *ExoI* (no. de cat. EN0581) y *SAP* (no. de cat. EF0651). Finalmente, los productos de PCR purificados se marcaron utilizando el kit BigDye® v3.1 Cycle Sequencing (no. de cat. 4337455; Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) según las especificaciones del fabricante, los productos de PCR marcados fueron analizados en el equipo ABI PRISM™ 3100-Avant
25
30 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Los datos de secuenciación obtenidos por BSP se analizaron utilizando el software Chromas v2.6.4 (Technelysium Pty. Ltd.) y los programas de paquete informáticos Lasergene v7 (DNASTAR, Inc.).

En donde, para efectos de esta invención, para la técnica de BSP (PCR para secuenciación de DNA modificado con bisulfito de sodio) se considera como hipometilado a una frecuencia de metilación

<40%, como hemimetilado a una frecuencia de metilación que va del 40% al 60%, y como hipermetilado a una frecuencia de metilación >60%. Por otro lado, si se emplea la técnica de MSP (PCR específica para metilación) se considera como hipometilado solo cuando el oligonucleótido que reconoce sitios CpGs no metilados (U) amplifica, como hemimetilado cuando ambos oligonucleótidos que reconocen sitios CpGs metilados (M) y no metilados (U) amplifican, y como hipermetilado solo cuando el oligonucleótido que reconoce sitios CpGs metilados (M) amplifica.

4) **Determinación de asociaciones estadísticas**

El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism v4.0 (GraphPad Software, Inc.). ANOVA de una vía con prueba Turkey post hoc fue usada para evaluar diferencias significativas en el nivel de expresión génica y niveles de metilación para los tratamientos con 5-AzadC, TSA y siRNAs. Se consideró una $p < 0.05$ para indicar una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de datos presentados.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Selección del modelo de estudio.

Dado que se ha demostrado que E7 de los VPH-AR interactúan con Dnmt1 y HDAC1, el objetivo de la presente invención fue determinar el patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* en líneas celulares derivadas de tumor HeLa, SiHa y Ca Ski positivas para VPH16 y VPH18, y su asociación con los factores de transcripción Snai1 y Snai2, que son reguladores negativos de la expresión de *CDH1* e inductores del proceso de transición epitelio-mesenquima (EMT) y asociados a metástasis [26-29].

Las líneas celulares derivadas de tumor HeLa, SiHa y Ca Ski fueron seleccionadas como modelos de estudio *in vitro* debido a que son representativas de los tipos de cáncer más frecuentes del cuello uterino con infección positiva a VPH-AR, poseen diferente carga viral y orígenes epiteliales. En donde según como fue reportado por la *American type culture collection* (ATCC), HeLa es una línea celular derivada de un adenocarcinoma de cuello uterino de una mujer afroamericana y que contiene de 10 a 50 copias del genoma de VPH18 integradas por célula; SiHa es una línea celular derivada de un carcinoma de células escamosas de cuello uterino grado II de una mujer asiática y que contiene de 1 a 2 copias del genoma de VPH16 integradas por célula; y Ca Ski es una línea celular derivada de un carcinoma epidermoide de cuello uterino de una mujer caucásica y que contiene de 500 a 600 copias del genoma de VPH16 integradas por célula.

Por otro lado, se utilizó a la línea celular HaCaT como control negativo de cáncer y control negativo de infección por VPH, en donde HaCaT es una línea celular epidérmica humana inmortalizada no tumorigénica derivada de queratinocitos de la piel.

Dichas líneas celulares fueron adquiridas en la ATCC y fueron autenticadas mediante perfiles de STR DNA (número de identificación DP0297) por el Centro de Secuenciación y Análisis de DNA de la Universidad de Colorado (Denver, CO, USA).

Las líneas celulares HeLa, SiHa y HaCaT se cultivaron en DMEM (no. de cat. 12800-058; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y las células de Ca Ski se cultivaron en RPMI (no. de cat. 31800-014; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.), todas las líneas celulares se suplementaron con suero fetal bovino al 10% (SFB; no. de cat. 16000-044; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) y penicilina-estreptomicina a 1x (no. de catálogo 15140122; Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.). La incubación se realizó en una cámara humidificada a 37 °C con tensión de CO₂ al 5% en una incubadora de CO₂ SANYO MCO-19AIC-UVH.

EJEMPLO 2. Determinación del patrón de metilación de la región promotora de CDH1 en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH16 y VPH18.

En este ejemplo se analizó el DNA genómico obtenido de las líneas celulares derivadas de tumor HeLa (positiva a VPH18), SiHa y Ca Ski (positivas a VPH16), y de la línea celular HaCaT como control negativo de cáncer y de infección por VPH. Detectándose un patrón de metilación sitio específico común en ciertas islas CpGs (-160, -150, -131 y -122) de la región promotora de CDH1 en líneas celulares derivadas de tumor HeLa y SiHa. Otras islas CpGs fueron identificadas (-45, -136, -105, -103, -83, -57, -52, -45, -36, -13, +6 y +9) que están metiladas únicamente en la línea celular HeLa (Fig. 1B). Notablemente, la línea celular Ca Ski no mostró metilación de ninguno de los 17 sitios CpG del promotor de CDH1 que fueron analizados (Fig. 1B).

Resultados. La cuantificación de los niveles de metilación en la región promotora de CDH1 indicó que las células HeLa presentaron una frecuencia de metilación del 88.24% (hipermetilado), las células SiHa exhibieron una frecuencia de metilación del 17.65% (hipometilado) y las células de Ca Ski mostraron una frecuencia del 0% (desmetilado) al igual que HaCaT (Fig. 1B).

Conclusión. La región promotora de CDH1 presenta diferentes patrones de metilación en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH16 y VPH18. En este sentido, se conoce en el estado de la técnica que tanto la infección por VPH y la carga viral despiertan la maquinaria de metilación celular como un mecanismo de defensa contra DNA foráneo [10-12, 35] y que además se ha mostrado que tanto el genoma de VPH y la región larga de control (LCR) de VPH se encuentran hipometilados en las líneas celulares HeLa y SiHa, e hipermetilados en la línea celular Ca Ski [11, 36], sugiriendo que la maquinaria de metilación celular puede tener una acción sitio dirigida, silenciando por metilación los genomas virales altamente repetitivos, como se observa en Ca Ski que posee entre 500 a 600 copias virales integradas en el genoma celular.

35

EJEMPLO 3. Determinación del nivel de expresión de *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *E7* de VPH16 y *E7* de VPH18 en las líneas celulares derivadas de tumor positivas y negativas a VPH

Para obtener los valores de los niveles de expresión a nivel de mRNA de los genes *CDH1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *E7* de VPH16 y *E7* de VPH18 en las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y HaCaT, se usó una muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH (Human Cervix Total RNA, no. de cat. AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) como referencia para obtener los valores relativos. Los valores de ΔCt de cada gen se normalizaron con el gen de referencia GAPDH utilizando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) [37]; el valor relativo de 1 para la muestra comercial de cérvix normal negativo para VPH no se graficó en la Fig. 2A. Para el análisis estadístico, la línea celular HaCaT se usó como referencia para la comparación, debido al hecho de que estas células son células epidérmicas humanas inmortalizadas no tumorigénicas.

Resultados. El análisis de la expresión de *CDH1* en las diferentes líneas celulares mostró una disminución significativa del nivel de mRNA de *CDH1* en las líneas celulares HeLa ($P<0.001$) y SiHa ($P<0.01$) en comparación con la línea celular HaCaT (Fig. 2A). Se observó una disminución similar a nivel de proteína (Fig. 2B). Por el contrario, la línea celular Ca Ski mostró una alta expresión de *CDH1*, similar a la línea celular control HaCaT, tanto en los niveles de mRNA como de proteína (Fig. 2A y B).

Conclusión. Los niveles de metilación en la región promotora de *CDH1* se asocian con los niveles de expresión de *CDH1* tanto a nivel de mRNA como de proteína. En donde un estado de hipermetilación en el promotor de *CDH1* se relaciona con una casi nula expresión de *CDH1* a nivel de mRNA ($P<0.001$, Fig. 2A) y una nula expresión a nivel proteína (Fig. 2B) en la línea celular derivada de tumor HeLa; por otro lado, un estado de hipometilación en el promotor de *CDH1* se relaciona con una disminución de la expresión de *CDH1* tanto a nivel de mRNA como de proteína ($P<0.01$, Fig. 2A y B) en la línea celular derivada de tumor SiHa.

EJEMPLO 4. Determinación del fenotipo mesenquimal en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH

Para probar la hipótesis de que la expresión de *CDH1* está regulada por los factores de transcripción *Snai1* y *Snai2*, que son mediadores de la TEM al regular negativamente la expresión de *CDH1*, se midió la expresión de *SNAI1* y *SNAI2* en las líneas celulares HeLa, SiHa, Ca Ski y HaCaT.

Resultados. El nivel de expresión de *SNAI1* está incrementado significativamente a nivel de mRNA en HeLa ($P<0.0001$) y células SiHa ($P<0.001$), pero está reducido significativamente en células Ca Ski ($P<0.01$) en comparación con células HaCaT (Fig. 2A). Notablemente, se observó que este resultado se reflejó a nivel de proteína también (Fig. 2B). No se observaron diferencias significativas en la expresión de *SNAI2*, tanto en los niveles de mRNA (Fig. 2A) como de proteína (Fig. 2B) entre todas las líneas celulares.

Conclusión. Nuestros resultados mostraron que las líneas celulares HeLa y SiHa presentan un fenotipo mesenquimal, el cual se asocia con una baja o nula expresión de E-cadherina (CDH1) y alta expresión de Snai1, concluyendo así que el nivel de expresión de *CDH1* se asocia inversamente con el nivel de expresión de *SNAI1*. Por otro lado, la línea celular Ca Ski presenta un fenotipo epitelial o mesenquimático con un alto nivel de expresión de E-cadherina y con baja expresión de Snai1 y Snai2; en este sentido y dado que la línea celular Ca Ski presenta un fenotipo no mesenquimático se decidió no continuar con futuros análisis de esta línea celular.

EJEMPLO 5. Los tratamientos con el inhibidor de DNMTs y con el inhibidor de HDACs ejercen un efecto sobre el patrón de metilación y sobre la reexpresión de *CDH1* en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH

Tratamientos con agentes de regulación epigenética. El inhibidor de DNMTs (5-AzadC) y el inhibidor de HDACs (TSA) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Merck KGaA; no. de cat. A3656 y T8552, respectivamente) y fueron resuspendidos en DMSO grado Biología Molecular (Sigma-Aldrich; Merck KGaA; no. de cat. D8418) para obtener un stock de trabajo de 5-AzadC a 10.0 mM y un stock de trabajo de TSA de 1.0 mM. Los stocks de trabajo de 5-AzadC y TSA fueron alicuotados, se protegieron de la luz y se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

Por triplicado, se sembraron 450,000 células de HeLa y 500,000 células de SiHa en cajas p60 y luego se trataron con 5 y 10 μ M de 5-AzadC, respectivamente, y 200 y 500 nM de TSA, respectivamente. Las células HeLa y SiHa no tratadas (NT) o las células HeLa y SiHa sometidas a tratamiento con DMSO se usaron como controles para normalizar los valores de expresión relativa, así como para realizar comparaciones en el análisis estadístico. El volumen total de medio de cultivo fue de 3 mL suplementado con 10% de SFB y sin antibióticos. Los ensayos se realizaron protegidos de la luz y las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió a las 24 h debido a la vida media del 5-AzadC y TSA.

Resultados. Se observó que, en la línea celular HeLa, el patrón de metilación se mantuvo en los sitios CpG -103, -105 y -160 de la región promotora de *CDH1* después de los tratamientos con 5-AzadC y TSA. Por el contrario, en la línea celular SiHa, estos sitios se desmetilaron completamente en los tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M y TSA a una concentración de 500 nM y solo el sitio CpG -52 se mantuvo metilado después del tratamiento con TSA a 200 nM (Fig. 3A y C). En términos de nivel de metilación posterior al tratamiento y teniendo como referencia las líneas celulares HeLa y SiHa no tratadas (NT), se observó en la línea celular HeLa una disminución en la metilación del 76.48% en ambos tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M, mientras que con los tratamientos con TSA a 200 y 500 nM se observó una disminución en la metilación del 68.63%. Por otro lado, en la línea celular SiHa, se observó una disminución del 21.57% con los tratamientos con 5-AzadC a 5 y 10 μ M y el tratamiento con TSA a

500 nM, quedando la región promotora de *CDH1* completamente desmetilada, mientras que con el tratamiento con TSA a 200 nM se observó una disminución en la metilación del 17.65%.

Conclusión. En este sentido, se demostró en ambas líneas celulares, que el tratamiento con 5-AzadC y TSA disminuyó significativamente el nivel de metilación ($P < 0.001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para determinar cuál de los dos tratamientos induce una mayor inhibición de metilación en la región promotora de *CDH1*, puesto que ambos tratamientos fueron igual de efectivos (Fig. 3B y D).

Por otro lado, en la línea celular HeLa, los tratamientos con 5-AzadC a 10 μM ($P = 0.004$) y TSA a 500 nM ($P = 0.03$) aumentaron significativamente la expresión de *CDH1* tanto a nivel de mRNA como de proteína (Fig. 4A y G). Además, TSA a 500 nM aumentó significativamente la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA ($P = 0.01$; Fig. 6B) sin cambios aparentes a nivel de proteína (Fig. 4I). En la línea celular SiHa, la expresión de *CDH1* aumentó significativamente a nivel de mRNA con 5-AzadC a 5 μM ($P = 0.05$) y a 10 5 μM ($P = 0.01$) y TSA a 500 nM ($P = 0.004$, Fig. 4D), se observó un efecto similar a nivel de proteína (Fig. 4H). Además, la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA aumentó significativamente con 5-AzadC a 10 μM ($P = 0.004$) y TSA a 500 nM ($P = 0.01$) (Fig. 4E) sin cambios aparentes a nivel de proteína (Fig. 4J), similar a lo observado en HeLa.

Notablemente, y respecto a lo observado de que los tratamientos con 5-AzadC y TSA solo aumentaron los niveles de expresión de mRNA de *SNAI1* en las líneas celulares HeLa (Fig. 4B e I) y SiHa (Fig. 4E y J), pero no se observaron cambios aparentes de *SNAI1* a nivel de proteína (Fig. 4I y J). Estos hallazgos concuerdan con otros estudios en los que dichos tratamientos no solo restablecieron la expresión de *CDH1*, sino que también indujeron una sobreexpresión a nivel de mRNA de *SNAI1* y *SNAI2* [38-41], lo que probablemente se deba a modificaciones en el patrón de metilación en regiones promotoras de *SNAI1* y *SNAI2* [42]. La expresión de *SNAI2* no se modificó significativamente a nivel de mRNA bajo cualquier condición de tratamiento en ambas líneas celulares (Fig. 4C y F).

En otro aspecto, es conocido que la TSA no es un agente de desmetilación; sin embargo, notablemente, en este ejemplo se observó una desmetilación en el promotor de *CDH1* después del tratamiento con TSA. Este efecto concuerda con otros estudios que han reportado que la TSA causa la desmetilación del DNA y han propuesto que un cambio en la modificación de la cromatina, incluida la desacetilación de las histonas inducida por un inhibidor de la HDAC, podría hacer que un gen sea susceptible a la desmetilación del DNA por la maquinaria de desmetilación [39, 41].

EJEMPLO 6. El tratamiento o transfecciones con RNA pequeño de interferencia sintético (siRNA) contra E7 de VPH-HR modifica los patrones de metilación del promotor de *CDH1* e induce la expresión de *CDH1* en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH

Tratamientos con siRNAs contra E7 de VPH. Para efectos de esta invención, se emplearon los siRNAs: siRNA-E7VPH16 y siRNA-E7VPH18 (Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.; IDs s237642 y s237640, respectivamente). Nosotros usamos el Silencer® Select GAPDH siRNA (Hs, Mm, Rn) (cat. no. 4390849; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) como control positivo de transfección para poder
5 seleccionar el agente de transfección (Lipofectamine® 2000 contra siPORT™ NeoFX™) y para optimizar el silenciamiento génico sin afectar la viabilidad celular, esto de acuerdo con el protocolo del fabricante y como ha sido divulgado previamente [43-47]. Los siRNAs se resuspendieron en agua destilada libre de DNAasa/RNAasa UltraPure™ (no. de cat. 10977-015; Thermo Fisher Scientific, Inc) para obtener un stock de trabajo de 10 µM. Los stocks de trabajo se dividieron en alícuotas y se
10 almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

La transfección con los siRNAs se realizó por triplicado utilizando el kit siPORT™ NeoFX™ (no. de cat. AM4511; Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En cada pozo de una placa de cultivo celular de 12 pozos, se sembraron 75,000 células de HeLa y 80,000 células de SiHa. Las células HeLa se transfectaron luego con 30 nM de siRNA contra E7 de VPH18 y las
15 células SiHa se transfectaron con 30 nM de siRNA contra E7 de VPH16. Por otro lado, 30 nM de siRNA dirigido contra GAPDH se transfectó como un control positivo de transfección. Se usaron células no transfectadas (NT) o células sometidas a tratamiento con el agente de transfección siPORT™ NeoFX™ con medio Opti-MEM® I como controles negativos. El volumen final de medio de cultivo de transfección fue de 1.2 mL, suplementado con 12% de SFB y sin antibióticos. Las células se incubaron durante 48
20 horas a 37°C con 5% de tensión de CO₂.

Resultados. Para examinar la participación de E7 en el patrón de metilación y en la expresión de *CDH1*, las líneas celulares derivadas de tumor HeLa y SiHa se transfectaron con siRNAs contra E7 de VPH 16 y 18, lo que dio como resultado una reducción del 57.9% y 42.5% en el nivel de mRNA de E7, respectivamente (Fig. 6A y C). En la línea celular HeLa, la reducción de E7, condujo a la desmetilación de
25 los sitios CpG del promotor de *CDH1* localizados entre las posiciones +9 a -45, así como en las posiciones -103 y -122 a -136 (Fig. 5A). Por otro lado, en la línea celular SiHa, se observó una desmetilación total en el promotor de *CDH1* después del silenciamiento de E7 (Fig. 5C). Por lo tanto, el silenciamiento parcial de E7 en las líneas celulares HeLa y SiHa produjo una disminución significativa en la metilación de la
30 región promotora de *CDH1* en comparación con las células control no transfectadas ($P < 0.001$; Fig. 5B y D). Concomitantemente, se observaron niveles aumentados de mRNA y proteína de *CDH1* después del silenciamiento de E7 en HeLa (Fig. 6B y F) y SiHa (Figura 6B y G).

Conclusión. El uso de Silencer® Select GAPDH siRNA como control positivo de transfección nos permitió descartar que los cambios en el patrón de metilación del promotor *CDH1* se debieran a las condiciones de transfección del siRNA. El silenciamiento de *GAPDH* no indujo cambios significativos en
35 el patrón de metilación del promotor *CDH1* tanto en las células HeLa ($P = 0.7140$; Fig. 5B) como en las

células SiHa (P=0.3248; Fig. 5D), lo que demuestra que tales cambios en el patrón de metilación son debido al silenciamiento E7.

EJEMPLO 7. La supresión de E7 por siRNA en las líneas celulares derivadas de tumor positivas a VPH disminuye la expresión de SNAI1 y SNAI2.

5

Se identificó que el silenciamiento de E7 no solo induce la expresión de *CDH1*, sino que también disminuye significativamente la expresión de *SNAI1* y *SNAI2* (P<0.001) en las líneas celulares HeLa y SiHa (Figs. 6D, E, H e I). Esto podría indicar que E7 no solo está involucrado en la supresión de la expresión de *CDH1*, sino que también regula la expresión de *SNAI1* y *SNAI2*, los cuales regulan negativamente a *CDH1*.

10

Esto resultados concuerdan de forma similar con el mecanismo de acción reportado para otros virus oncogénicos, en donde la proteína X del VHB (HBx), la proteína core del VHC y la proteína de la membrana latente 1 (LMP1) del VEB promueve la TEM y la metástasis al inducir la expresión de *SNAI1* [48-51].

15

EJEMPLO 8. La supresión de GAPDH por siRNA disminuye la expresión de SNAI1 en HeLa.

Notablemente, se identificó que el silenciamiento de GAPDH con siRNA dio como resultado una disminución parcial en la expresión de Snai1 a nivel de proteína en células HeLa (Fig. 6H). Esto es consistente con otro estudio que reportó en un modelo de líneas celulares HCT116 y LoVo que derivan de cáncer de colon, de que la interacción de GAPDH con Sp1 da como resultado un aumento de la expresión de Snai1, el cual promueve la proliferación y metástasis de las células cancerosas, y que la supresión de GAPDH con shRNA da como resultado una disminución significativa de Snai1 [52].

20

EJEMPLO 9. Las líneas celulares que derivan de tumor de cuello uterino presentan diferentes niveles de expresión de CDH1, SNAI1 y GAPDH.

25

Debido a que se utilizaron los housekeeping *GAPDH* y *HPRT* para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados, no se observaron diferencias significativas en la reducción de la expresión de *SNAI1* a nivel de mRNA (Fig. 6D). En este sentido, adicionalmente se determinó el nivel de expresión de los genes *GAPDH*, *CDH1* y *SNAI1*, los cuales fueron normalizados contra β -*ACTINA* (Fig. 7), en donde se observó que:

30

- *CDH1* se expresa 0.8 veces más en HaCaT, 0.6 veces menos en HeLa, 0.4 veces menos en SiHa y 1.5 veces más en Ca Ski, usando como referencia a la muestra comercial de cérvix normal (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.);
- *SNAI1* se expresa 1.1 veces menos en HaCaT, 2.2 veces más en HeLa, 2.6 veces más en SiHa y 0.9 veces menos en Ca Ski, usando como referencia a la muestra comercial de cérvix normal (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.); y que

35

20

- *GAPDH* se expresa 2.6 veces más en HaCaT, 1.6 veces más en HeLa, 3.3 veces más en SiHa y 3.8 veces más en Ca Ski, usando como referencia a la muestra comercial de cérvix normal (Human Cervix Total RNA, AM6992, Ambion; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

5 Esto sugiere que *GAPDH* podría desempeñar un papel en la metástasis del cáncer de cuello uterino al afectar la TEM a través de la regulación positiva de la expresión de *Snai1* mediada por Sp1, similar a la función reportada en el cáncer de colon [52].

APLICACIÓN TÉCNICA DE LA INVENCIÓN

10 Con base en los ejemplos anteriores, hemos ilustrado en la Fig. 8 un modelo esquemático de como el VPH podría inducir la TEM a través de la oncoproteína E7 de VPH y de *SNAI1*. Nuestros resultados revelan que E7 de VPH no solo induce la expresión de *SNAI1*, un regulador negativo de *CDH1*, sino que también regula la expresión de *CDH1* a través de la metilación de su región promotora, probablemente al activar la maquinaria de metilación celular (Fig. 8A).

15 Observamos también, que la supresión de E7 no solo aumenta la expresión de *CDH1*, sino que también disminuye notablemente la expresión de *SNAI1* y modifica el patrón de metilación del promotor de *CDH1*, lo que indica que la expresión de *CDH1* depende de la expresión de *SNAI1* y se asocia inversamente con la expresión de E7 (Fig. 8A).

20 En resumen, los resultados actuales indican que E7 de VPH-AR puede regular la expresión de *CDH1* por dos vías diferentes en las que *Snai1* está involucrado. La primera vía implica la hipermetilación de la región promotora de *CDH1* y la expresión de *Snai1*, como se observa en la línea celular HeLa (Fig. 8B); la segunda vía implica la hipometilación de la región promotora de *CDH1* con la expresión de *Snai1* como se observa en la línea celular SiHa (Fig. 8C).

25 En este sentido y con base en los hallazgos presentados en esta invención, sería deducible para un técnico en la materia que la determinación del nivel de expresión de *CDH1* y *SNAI1*, y la determinación del estado y/o patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* podrían considerarse como: (i) biomarcadores para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (ii) para pronosticar la susceptibilidad de desarrollar metástasis en un sujeto que tiene una lesión neoplásica o un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (iii) biomarcadores para diagnosticar que un tumor asociado virus oncogénico tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal o un fenotipo
30 invasivo, y/o como (iv) biomarcadores para el empleo de agentes terapéuticos de regulación epigenética, tales como agentes que inhiben a DNA metiltransferasas y/o agentes que inhiben a desacetilasas de histonas, en el tratamiento de un cáncer con potencial metastásico asociado a virus oncogénico, en donde el virus oncogénico es el Virus de Papiloma humano (VPH).

35

REFERENCIAS

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. 136(5): p. E359-86.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
- 5 3. zur Hausen, H., *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account*. Virology, 2009. 384(2): p. 260-5.
4. Bansal, A., M.P. Singh, and B. Rai, *Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem*. Int J Appl Basic Med Res, 2016. 6(2): p. 84-9.
- 10 5. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
6. Doorbar, J., *Latent papillomavirus infections and their regulation*. Curr Opin Virol, 2013. 3(4): p. 416-21.
7. Schiffman, M., et al., *Carcinogenic human papillomavirus infection*. Nat Rev Dis Primers, 2016. 2: p. 16086.
- 15 8. Durst, M., et al., *The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours*. J Gen Virol, 1985. 66 (Pt 7): p. 1515-22.
9. Lehn, H., et al., *Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract*. J Gen Virol, 1988. 69 (Pt 1): p. 187-96.
- 20 10. Badal, S., et al., *The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation*. Virology, 2004. 324(2): p. 483-92.
11. Fernandez, A.F., et al., *The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer*. Genome Res, 2009. 19(3): p. 438-51.
- 25 12. Kalantari, M., et al., *Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines*. Virology, 2008. 374(2): p. 292-303.
13. Boyer, S.N., D.E. Wazer, and V. Band, *E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Res, 1996. 56(20): p. 4620-4.
- 30 14. Munger, K., et al., *The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes*. J Virol, 1989. 63(10): p. 4417-21.
15. Brehm, A., et al., *The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth*. EMBO J, 1999. 18(9): p. 2449-58.
- 35 16. Burgers, W.A., et al., *Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases*. Oncogene, 2007. 26(11): p. 1650-5.
17. Liu, J., et al., *Downregulation of E-cadherin by hepatitis B virus X antigen in hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2006. 25(7): p. 1008-17.
- 40 18. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *Viruses associated with human cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1782(3): p. 127-50.
19. Tsai, C.N., et al., *The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(15): p. 10084-9.
- 45 20. Arora, P., et al., *Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b*. Cancer Lett, 2008. 261(2): p. 244-52.
21. Laurson, J., et al., *Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein*. Carcinogenesis, 2010. 31(5): p. 918-26.
22. Específico., P.d.A., *Prevención y control del cáncer de la mujer 2013-2018. México, Secretaría de Salud*. 2014.
- 50 23. Pública, I.N.d.S., *Laboratorio de Investigación y Análisis Molecular del Virus del Papiloma Humano - LADIMOLVPH*. 2015.
24. Granados Garcia, M., O. Arrieta Rodriguez, and C. de Leon, *Oncología y cirugía: bases y principios*. 2013.

25. Montalvo, G., et al., *Onco guía: Cáncer Cervicouterino*. Cancerología, 2011. 6: p. 61-69.
26. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. 2(2): p. 76-83.
27. Moreno-Bueno, G., et al., *Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2006. 66(19): p. 9543-56.
28. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. 7(6): p. 415-28.
29. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, *Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis*. Int J Dev Biol, 2004. 48(5-6): p. 365-75.
30. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(6): p. 449-58.
31. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(6): p. 442-54.
32. Perl, A.K., et al., *A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma*. Nature, 1998. 392(6672): p. 190-3.
33. Poser, I., et al., *Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail*. J Biol Chem, 2001. 276(27): p. 24661-6.
34. Yokoyama, K., et al., *Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro*. Oral Oncol, 2001. 37(1): p. 65-71.
35. Badal, V., et al., *CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression*. J Virol, 2003. 77(11): p. 6227-34.
36. Rosendo-Chalma, P., *Análisis de metilación del ADN de VPH 16 integrado al genoma celular*. 2009, Universidad Autónoma de Guerrero: Chilpancingo; Guerrero.
37. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
38. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet, 1999. 21(1): p. 103-7.
39. Liu, Y.N., et al., *Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression*. Oncogene, 2005. 24(56): p. 8277-90.
40. Meng, F., et al., *Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer*. Br J Cancer, 2013. 108(3): p. 579-86.
41. Ou, J.N., et al., *Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines*. Biochem Pharmacol, 2007. 73(9): p. 1297-307.
42. Chen, Y., et al., *DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 430(3): p. 1083-90.
43. Borawski, J., et al., *Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format*. J Biomol Screen, 2007. 12(4): p. 546-59.
44. Han, H., *RNA Interference to Knock Down Gene Expression*. Methods Mol Biol, 2018. 1706: p. 293-302.
45. Makpol, S., Zainuddin, A., Chua, K. H., *GAPDH expression as a measurement of transfection efficiency for p16 INK4a gene silencing (siRNA) in senescent human diploid fibroblasts*. American Journal of Molecular Biology, 2012. 2: p. 390-397.
46. Peter Hahn, J.D., Wolfgang Bielke and Jie Kang, *Patent: EP2240582 B1 - Positive controls for expression modulating experiments*. European Patent Office, October 23, 2013.
47. Sledz, C.A., et al., *Activation of the interferon system by short-interfering RNAs*. Nat Cell Biol, 2003. 5(9): p. 834-9.
48. Arzumanyan, A., et al., *Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer*. Oncogene, 2012. 31(5): p. 563-72.

49. Horikawa, T., et al., *Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma*. Br J Cancer, 2011. 104(7): p. 1160-7.
50. Liu, H., et al., *Hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell invasion and metastasis by stabilizing Snail protein*. Cancer Sci, 2012. 103(12): p. 2072-81.
51. Nie, D., et al., *Hepatitis C virus core protein interacts with Snail and histone deacetylases to promote the metastasis of hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2016. 35(28): p. 3626-35.
52. Liu, K., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promotes cancer growth and metastasis through upregulation of SNAI1 expression*. Int J Oncol, 2017. 50(1): p. 252-262.

10

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

- 5 1. Un método para identificar que un tumor asociado a VPH presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal, en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer procedente de un sujeto, y en donde dicho método comprende:
- (1) Determinar el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra de tumor,
- (2) Determinar el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* en
10 la muestra de tumor,
- (3) Comparar el nivel de expresión obtenido en (1) con el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra control, y
- (4) Comparar el estado y/o patrón de metilación obtenido en (2) con el estado y/o patrón de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en una muestra control.
- 15 En donde, si en la muestra de tumor:
- (i) La expresión de *CDH1* es baja o nula en comparación con un valor de referencia de una muestra control,
- (ii) Si *SNAI1* está sobre-expresado en comparación con un valor de referencia de una muestra control, y
- 20 (iii) Si la región promotora del gen *CDH1* esta hipometilada o hipermetilada en comparación con un valor de referencia de una muestra control,
- Entonces el tumor asociado a VPH presenta un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal.
- 25 2. Un método *in vitro* para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con un cáncer asociado a VPH y/o para pronosticar la susceptibilidad de desarrollar metástasis en un sujeto con una lesión neoplásica o cáncer asociado a VPH, en donde dicho método comprende:
- (1) Determinar el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra de una lesión neoplásica o cáncer asociado a VPH obtenida de dicho sujeto,
- (2) Determinar el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* en
30 la muestra de dicho sujeto,
- (3) Comparar el nivel de expresión obtenido en (1) con el nivel de expresión de los genes *CDH1* y *SNAI1* en una muestra control, y
- (4) Comparar el estado y/o patrón de metilación obtenido en (2) con el estado y/o patrón de metilación de la región promotora del gen *CDH1* en una muestra control,

En donde, si en la muestra de dicho sujeto:

- (i) La expresión de *CDH1* es baja o nula en comparación con un valor de referencia de una muestra control,
- 5 (ii) Si *SNAI1* está sobre-expresado en comparación con un valor de referencia de una muestra control, y
- (iii) Si la región promotora del gen *CDH1* esta hipometilada o hipermetilada en comparación con un valor de referencia de una muestra control,
- 10 Entonces el sujeto tiene un diagnóstico positivo para metástasis o una mayor susceptibilidad de desarrollar metástasis.
3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la lesión neoplásica asociada a VPH o el cáncer asociado a VPH tiene su origen en epitelio simple o en epitelio estratificado de cuello uterino, de región anal, de pene, vulva, vagina y/o cabeza y cuello, preferentemente en cuello uterino.
- 15 4. El método de conformidad con la reivindicación 3, en donde el cáncer de cuello uterino es cualquiera seleccionado de: adenocarcinoma de cuello uterino, carcinoma de células escamosas de cuello uterino y carcinoma epidermoide de cuello uterino.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la muestra del sujeto se selecciona de: células obtenidas por raspado, citología líquida o biopsia.
- 20 6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de expresión de *CDH1* y *SNAI1* se determina midiendo el nivel de mRNA por PCR en punto final o PCR en tiempo real.
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de expresión de *CDH1* y *SNAI1* se determina midiendo el nivel de proteína por Western blot,
- 25 citometría de flujo o por inmunohistoquímica.
8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* se determina por BSP, MSP, o por MS-HRM.
9. Un kit para realizar los métodos de conformidad con las reivindicaciones 1 a 8, en donde el kit comprende:
- 30 (i) Un juego de oligonucleótidos o anticuerpos para determinar la expresión de *CDH1* y *SNAI1* a nivel de mRNA o proteína en una muestra de un sujeto,

- (ii) Un juego de oligonucleótidos para determinar el patrón y/o estado de metilación de la región promotora del gen de *CDH1* por BSP, MSP o MS-HRM en una muestra de un sujeto.
- 5 10. Un inhibidor de DNA metiltransferasas para usarse en el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
- 10 11. Uso de un inhibidor de DNA metiltransferasas para preparar un medicamento para el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
- 15 12. El uso de conformidad con las reivindicaciones 10 y 11, en donde el inhibidor de DNA metiltransferasas se selecciona de cualquiera de: 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AzadC, Decitabina o Dacogen®), Azacitidina (Vidaza®), y/o Guadecitabina (SGI-110), preferentemente 5-AzadC (Decitabina).
- 20 13. El uso de conformidad con las reivindicaciones 10 y 11, en donde el inhibidor de DNA metiltransferasas promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al inducir la restauración de la expresión de CDH1.
- 25 14. Un inhibidor de desacetilasas de histonas para usarse en el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
- 30 15. Uso de un inhibidor de desacetilasas de histonas para preparar un medicamento para el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
16. El uso de conformidad con las reivindicaciones 14 y 15, en donde el inhibidor de desacetilasas de histonas se selecciona de cualquiera de: Trichostatina A (TSA o UNII-3X2S926L3Z), Vorinostat (Zolinza®), Belinostat (Beleodaq®), Romidepsin (Istodax®), Panobinostat (Farydak®) y/o Chidamide (CS055/Tucidinostat/Epza), preferentemente TSA (UNII-3X2S926L3Z).

17. El uso de conformidad con las reivindicaciones 14 y 15, en donde el inhibidor de desacetilasas de histonas promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al inducir la restauración de la expresión de CDH1.
- 5 18. Un siRNA dirigido contra E7 de VPH para usarse en el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
- 10 19. Uso de un siRNA dirigido contra E7 de VPH para preparar un medicamento para el tratamiento de un tumor asociado a VPH, en donde el tumor asociado a VPH ha sido identificado por el método de la reivindicación 1 como que tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal; y en donde el tumor asociado a VPH es una lesión neoplásica o un cáncer.
20. El uso de conformidad con las reivindicaciones 18 y 19, en donde el siRNA dirigido contra E7 de VPH es un siRNA dirigido contra E7 de VPH16 o un siRNA dirigido contra E7 de VPH18.
- 15 21. El uso de conformidad con las reivindicaciones 18 y 19, en donde el siRNA dirigido contra E7 de VPH promueve la pérdida del fenotipo metastásico o mesenquimal al promover la restauración de la expresión de CDH1 e inducir una disminución en la expresión de SNAI1.

RESUMEN

La presente invención trata sobre la determinación del nivel de expresión de *CDH1* y *SNAI1*, y la determinación del estado y/o patrón de metilación de la región promotora de *CDH1* como: (i) biomarcadores para el diagnóstico de metástasis en un sujeto con un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (ii) para pronosticar la susceptibilidad de desarrollar metástasis en un sujeto que tiene una lesión neoplásica o un cáncer asociado a virus oncogénico, y/o (iii) biomarcadores para diagnosticar que un tumor asociado virus oncogénico tiene un potencial metastásico o un fenotipo mesenquimal o un fenotipo invasivo, y/o como (iv) biomarcadores para el empleo de agentes terapéuticos de regulación epigenética, tales como agentes que inhiben a DNA metiltransferasas y/o agentes que inhiben a desacetilasas de histonas, en el tratamiento de un cáncer con potencial metastásico asociado a virus oncogénico, en donde el virus oncogénico es el Virus de Papiloma humano (VPH).

FIGURA 1

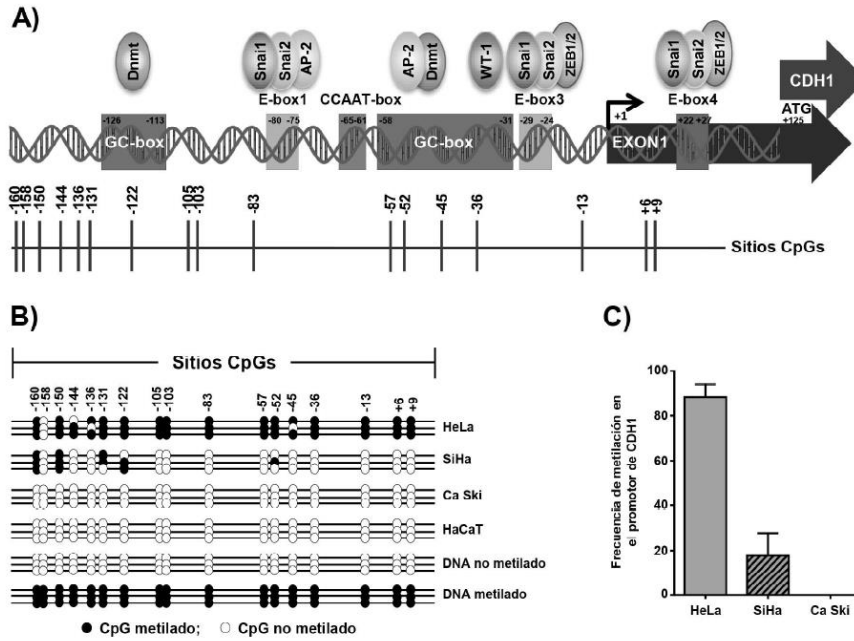


FIGURA 2

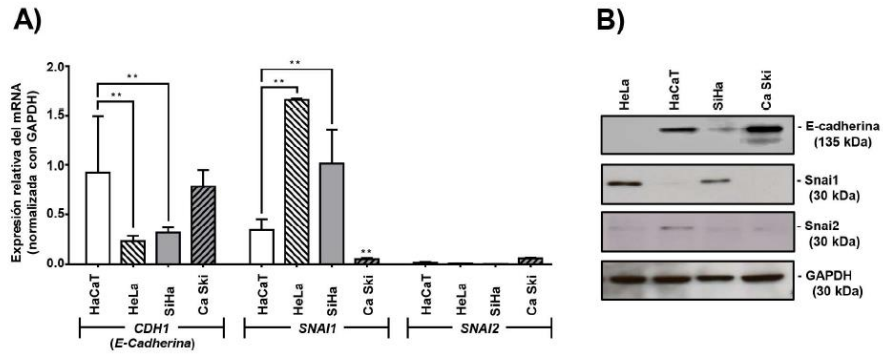


FIGURA 3

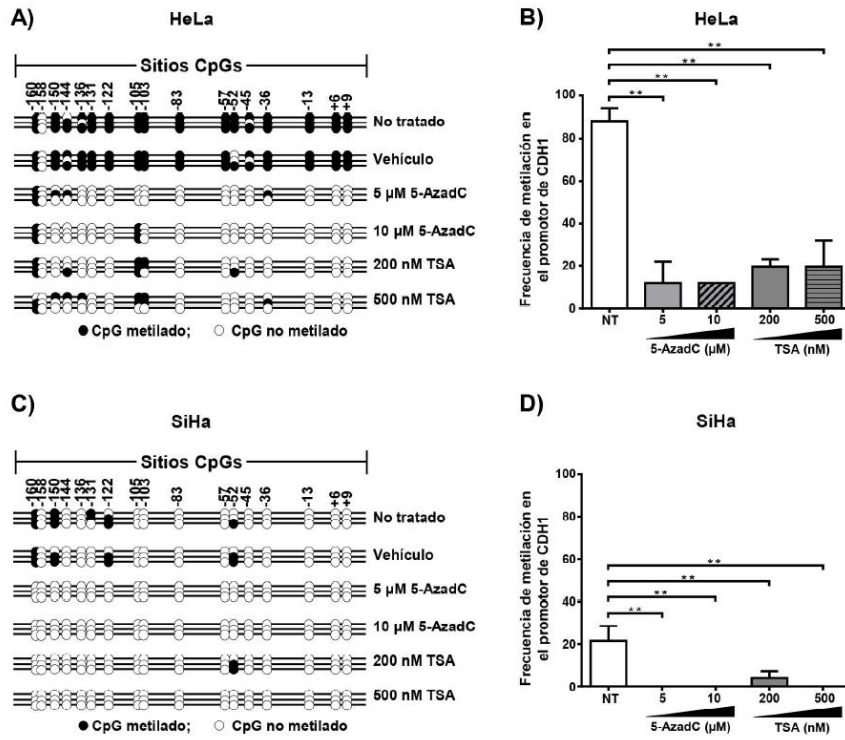


FIGURA 4

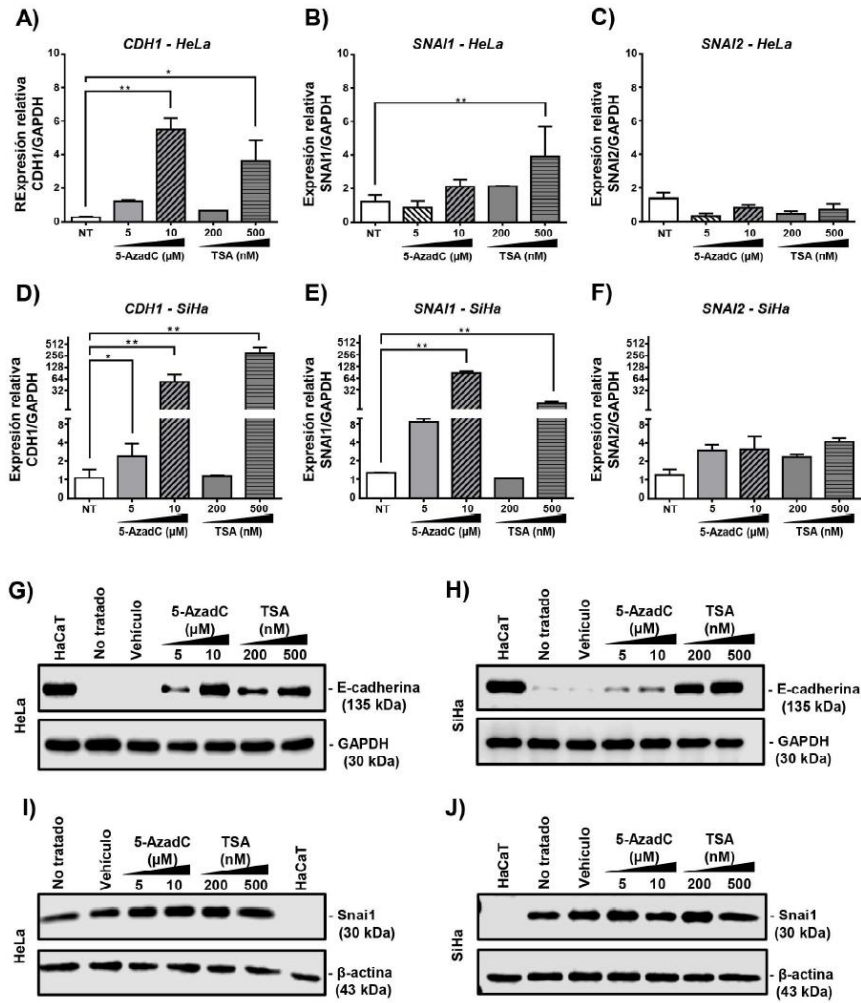


FIGURA 5

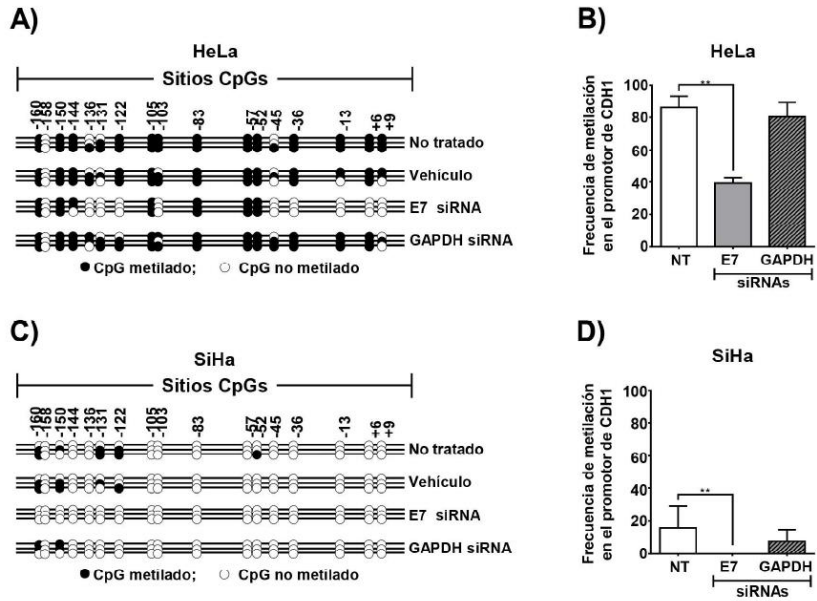
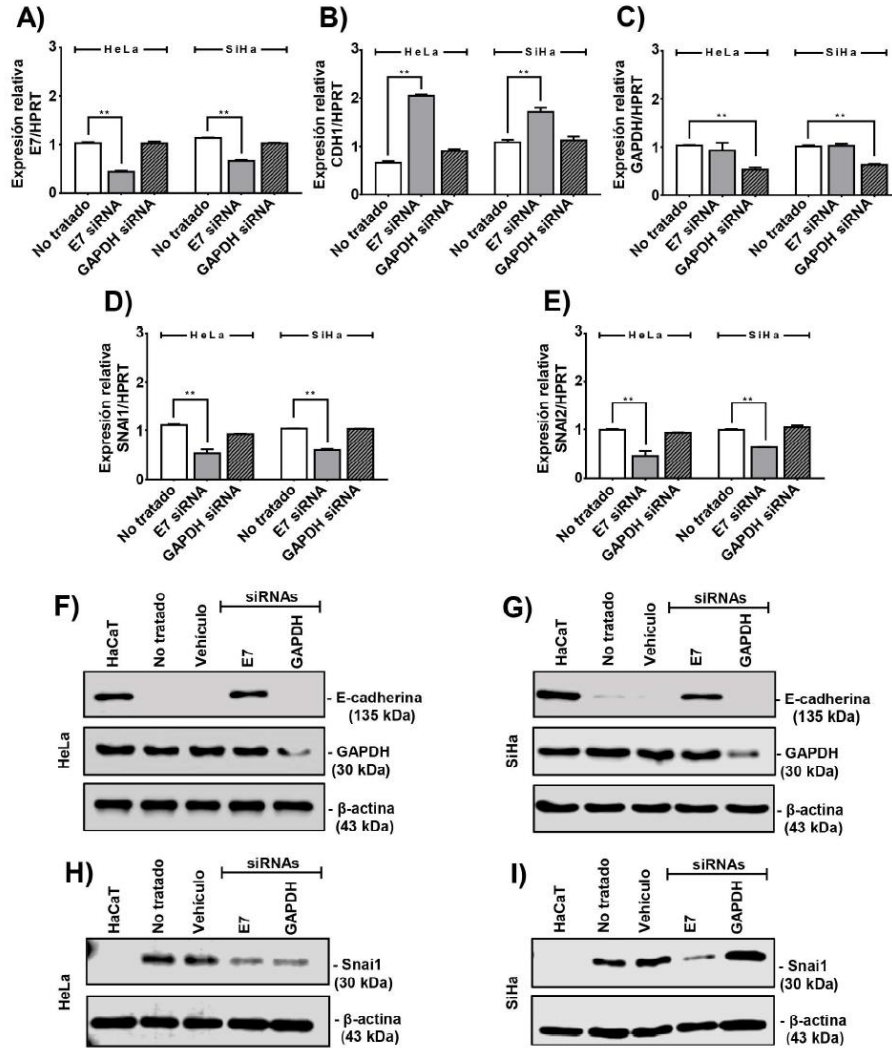


FIGURA 6



7/8

FIGURA 7

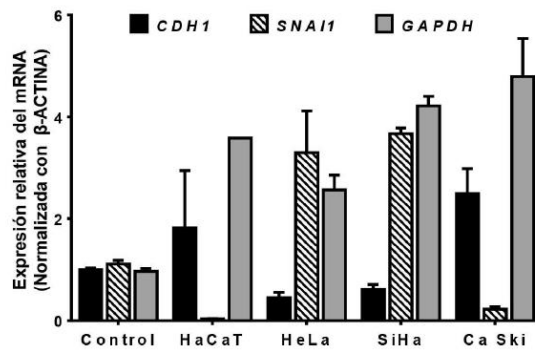
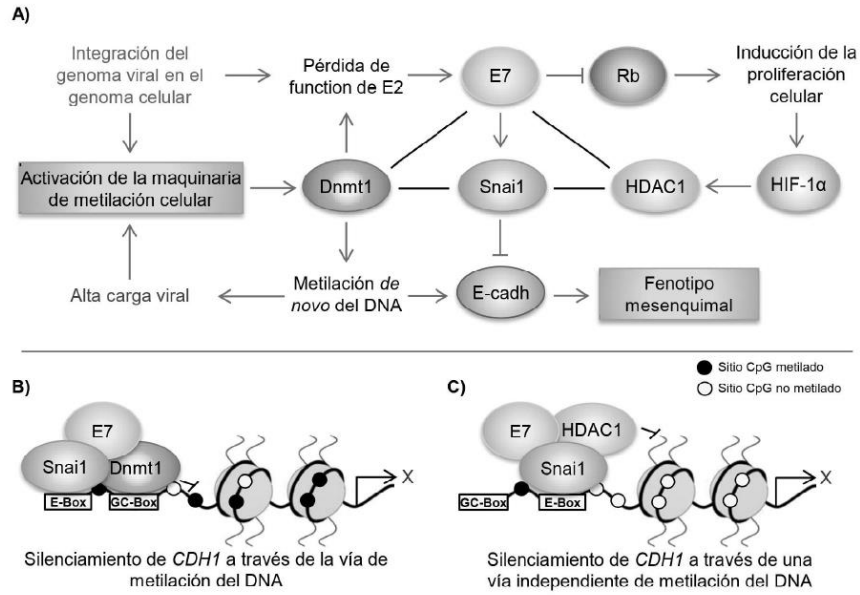


FIGURA 8





**University of Colorado
DNA Sequencing & Analyses Core**

University of Colorado Anschutz Medical Campus, Mailstop 8117
12801 East 17th Avenue, Aurora, CO 80045
Telephone: 303 – 724-3167, Fax 303 – 724 3889
Website: <http://loki.uchsc.edu>,
Email: Christopher.Korch@UCDenver.edu

MX/a/2019/014593

August 6, 2014

Drs. Alejandro García-Carrancá and Heriberto Abraham Valencia-González.
Biomedical Research Unit in Cancer, Laboratory 9
Department of Basic Research
National Cancer Institute Mexico
22 San Fernando Avenue (Tlalpan)
Mexico City, Distrito Federal
Mexico, CP 14080

Subject: DP0297 - 4 DNA samples submitted for cell line authentication by STR DNA profiling.

Hola Drs. Garcia-Carranca y Valencia Gonzalez!

We have completed the STR DNA profiling of the 4 samples of DNA that you submitted for STR DNA profiling utilizing service option #2 (the basic service STR profiling with any data analysis). This is a modification and update of the original report, which was for only option #1. The samples were labelled:

HeLa, SiHa, Ca Ski, and HaCaT

This report outlines how the samples were treated and the data analyzed. Should you need a copy of our explanation of the principles of STR DNA profiling, how we perform it, and how we interpret the data, please go to our website (<http://dnasequencingcore.ucdenver.edu>) where most of the current information is available.

OVERALL CONCLUSIONS

The DNA samples have been extracted from four unrelated samples of cells. Each of the samples are from one cell type and are not a mixture of cells from different genetic backgrounds. The HeLa sample does carry the 13.3-repeat allele at the D13S317 locus, which we have seen only in HeLa cells and has always been seen in all HeLa derivatives that we have STR genotyped.

- The Ca Ski profile shows that it is an authentic sample of this cell line.
- The STR profile of the DNA from your sample of the HaCaT cell line clearly shows that it is an authentic sample of this cell line.
- The STR profile of your sample of HeLa cells clearly shows that it is an authentic sample of this cell line.
- The SiHa profile shows that it is most an authentic sample of this cell line that the ATCC has in its repository.

Characterizing the DNA Samples you submitted for STR DNA Profiling.

We electrophoresed two aliquots (1 μ L and 3 μ L) of the undiluted DNA solutions on a 0.75% agarose gel. We estimated the DNA concentrations from the gel image by comparing the fluorescence of these diluted DNA preps with DNA bands in a Mass Ladder (Bioline HyperLadder I). Our estimates of the DNA concentrations were ranged between .17 and .29 of the values of your concentrations that you estimated spectrophotometrically (guessing you used a nanodrop).

Sample ID	DNA Name	Your Estimates of DNA Concentrations (ng/μL)	Our Estimates of DNA Concentrations (ng/μL)	Comments on DNA quality & purity
DP0297-01	Ca Ski	82.47	15	DNA = Hi MW, with minor amount of DNA shearing. No RNA present. Low, but usable yield.
DP0297-02	HaCaT	102.39	30	DNA = Hi MW, with minor amount of DNA shearing. No RNA present. Satisfactory yield.
DP0297-03	HeLa	225.12	40	DNA = Hi MW, with minor amount of DNA shearing. No RNA present. Satisfactory yield.
DP0297-04	SiHa	196.97	50	DNA = Hi MW, with minor amount of DNA shearing. Satisfactory yield.

Using our DNA concentration estimates, we made the necessary dilutions of the DNA samples to ~ 1 ng/μL and used them for the STR profiling PCR reactions.

RESULTS

STR DNA Profiling Multiplex PCR Reactions

Two aliquots of the undiluted and two aliquots of a 10-fold dilution of the samples were electrophoresed to obtain the optimal peak intensity in the 3730 Genetic Analyzer. Analysis on the ABI3730 capillary sequencer data showed that all four aliquots produced clean non-mixed profiles.

The "no DNA" control did not produce any detectable products as seen by capillary electrophoresis in the DNA Analyzer (ABI 3730). The control DNA reaction produced the expected products, both in amounts and sizes.

Your DNA samples gave suitable yields of PCR products with approximately the same amounts of PCR products as that obtained from the control DNA, as judged by the signal strengths by capillary electrophoresis (on the DNA sequencer).

We have included in the data package the following:

- An Excel file with three worksheets with the actual allele calls for the PCR reaction (DP0"order#"_Results Tables.xls). The different worksheets have different orders of the loci.
 - The first sheet is the one that has the loci in the order as they appear in the electropherograms (see included PDF files).
 - The second has the order of loci that is used by our search engine for comparing the profiles to our databases.
 - The third is a compressed version that shows all of the alleles at each locus within one box per locus using the same order as that on the second sheet.
 - A "0" (zero) indicates only that no allele was found and is only created by the Excel copy function that "pulls" data from one sheet to the next.
 - Any allele appearing in brackets (e.g., [#]) indicates they that is a minor peak, i.e., an allele that is probably real, but many of the cells in the population of cells from which the DNA was isolated have lost the allele. In the case of some cell lines, the profiles are unstable over time with increasing passages. This is probably due to 1) Microsatellite Instability (MSI) due to a defect in the cell's mismatch repair system, and 2) genetic drift due to selection for favorable chromosomal complements. **YOUR CELL LINES DID NOT SHOW THIS PHENOMENON**
- In the table below, the results are described briefly, including the subjective Heterozygosity Index. In our latest description of STR DNA profiling principles and methodology (which is available on line at

http://dnasequencingcore.ucdenver.edu) we describe our so-called "Heterozygosity Index." It is a semi-quantitative indication of whether there may have been some loss or change in chromosome number or heterozygosity in the population of cells from which the DNA had been isolated. At the heterozygous loci if the peaks are of unequal heights, this also suggests some loss or amplification of DNA regions/chromosomes, i.e., allelic imbalance in the population of cells. But note that these observations are **SUBJECTIVE** and should be verified by other means.

- PDF files of the electropherograms and the resulting data table (the PDF file consists of up to 10 pages) for the sample DNA. Also included are PDF files of the electropherograms from the controls (no DNA, control DNA 9947a, and the allelic ladder). The LIZ fluorophore, represented in the panel with orange peaks, is the size reference marker and the last panel for each sample. The order is Blue, Green, Black, Red, and Orange.
- Since you requested an upgrade to **Service Level #2**, we have included the results of searching our six databases of STR profiles for matching profiles. For your future reference, our databases include the following:
 - Our database of profiles using the ABI Identifiler profiling kit, which amplifies 15 autosomal loci plus the amelogenin locus that is present on both the X- and Y-chromosomes.
 - Our database of profiles using the ABI Profiler Plus profiling kit (obtained prior to June 2009), which amplifies 9 autosomal loci plus the amelogenin locus described above.
 - The set of profiles published Lorenzi et al. (Molecular Cancer Therapeutics 8: 713-724, 2009) and other publications based on using the ABI Identifiler profiling kit described above
 - The set of profiles published by JR Masters et al. (PNAS 98: 8012-8017, 2001) based on using ABI's SGM profiling kit, which amplifies 6 autosomal loci plus the amelogenin locus described above;
 - A set of profiles of cell lines created by Drs. Adi Gazdar and John Minna at the MD Anderson Cancer Center (many of the NCI-Hxyz cell lines were generated there). This set of data also include additional profiles for cell lines that they use and which have profiled by the ATCC; and
 - The Consolidated DSMZ Database that is based on using Promega's PowerPlex 1.2 profiling kit, which amplifies 8 autosomal loci plus the amelogenin locus described above.
- **Important Notes**
 - The consolidated DSMZ database is a 2009 consolidation of profiling data of over 2,200 cell line samples from the ATCC (American Type Culture Collection), the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), the JCRB (Japanese Collection of Research Biosources), and RIKEN (RBR; Riken BioResource Center of Japan) collections. In the online version of the consolidated database if only one allele was observed at a locus, then the cell line was assumed to be homozygous for that allele and the profile is shown as containing two identical alleles at that locus.
 - However, cell lines are known to lose chromosomes or have loci that have been amplified. Therefore, we believe this assumption is not valid and it artificially inflates the similarity scores determined by the similarity algorithm that the DSMZ uses. Our version of the DSMZ data has these duplicates removed and our search algorithm determines how many of the alleles in the test sample are present in the database cell line profiles.

Sample ID	DNA	Comments on DNA Profiling Results
DP0297-01	Ca Ski	Clean profile from a single FEMALE (has only the X-linked amelogenin allele). The LOW heterozygosity index of 4/15 suggests that the cell line has undergone extensive LOH during its cultivation since first established.

DP0297-02	HaCaT	Clean profile from a single FEMALE (has only the X-linked amelogenin allele). The heterozygosity index of 9/15 suggests that the cell line has NOT undergone <u>extensive</u> LOH during its cultivation since first established. This is supported by the similarity in the heights of the two peaks at most of the diallelic loci.
DP0297-03	HeLa	Clean profile from a single FEMALE (has only the X-linked amelogenin allele). The heterozygosity index of 11/15 suggests that the cell line has NOT undergone <u>extensive</u> LOH during its cultivation since first established. This is supported by the similarity in the heights of the two peaks at most of the diallelic loci. HOWEVER, it has the 13.3-repeat allele at the D13S317 allele which confirms that it is a HeLa derivative, which is known to have undergone chromothripsis.
DP0297-04	SiHa	Clean profile from a single FEMALE (has only the X-linked amelogenin allele). The heterozygosity index of 6/15 suggests that the cell line has undergone <u>some</u> LOH during its cultivation since first established.

Results of searching the six STR databases

DP0297-01 Ca Ski, unknown passage number

- The STR DNA Profile matches only itself in the Korch Identifier database.
- In the Consolidated DSMZ database, the Ca Ski profile that we determined matches that of four different samples of Ca Ski (two from the ATCC [CRL-1550, CRM-CRL-1550] one from the JCRB [IFO50007], and one from RIKEN [RCB1947]. These matches are 100% identical for the alleles at the loci that were tested in common.
- There are an additional 10 cell lines listed in the Consolidated DSMZ database that have greater than 80% similarity to the Ca Ski profiles. Generally, 80% or higher similarity is considered to indicate a match; however, these are not matches.
 - The reason the STR profiles have a similarity score greater than 80% is that the heterozygosity index of the Ca Ski cell line is quite low. This results in an apparent match to the true Ca Ski cell line profiles. If you examine the profiles at several of the loci, you will see that these lines have extra alleles that the true Ca Ski samples do not have.
- The Ca Ski profile of your sample did not have matches in any of the other databases of profiles: Korch Profiler Plus, Lorenzi and others Identifier, the Masters et al. dataset, and the Minna-Gazdar dataset.

Conclusion

- **The Ca Ski profile shows that it is an authentic sample of this cell line.**

DP0297-02 HaCaT, unknown passage number

- The STR DNA Profile for this DNA sample matches itself [100%] and that of a sample profiled earlier from a laboratory at this University [96%] in the Korch Identifier database. The earlier sample showed one difference at the CSF1PO locus, where it had lost the 9-repeat allele at this locus; whereas your sample had both a 9- and an 11-repeat allele at this locus.
- In the Masters et al. set of STR profiles, your sample matched a profile for this same cell line at 100% identity at the loci tested in common.
- The HaCaT profile of your sample did not have matches in any of the other databases of profiles: Korch Profiler Plus, Lorenzi and others Identifier, Consolidated DSMZ database and the Minna-Gazdar dataset.

Conclusion

- **The STR profile of the DNA from your sample of the HaCaT cell line clearly shows that it is an authentic sample of this cell line.**

DP0297-03 HeLa, unknown passage number

- The STR DNA Profile matches itself in the Korch Identifier database at 100% identity and the profile of 14 other samples of cell lines that are HeLa at 81% to 100% identity.
- There are several profiles that are samples of cell lines for which there are authentic samples, but these samples that were tested by us are from cultures that have been contaminated by HeLa. They include multiple samples of MDA-MB-231 from this campus and from the Dana Farber Institute in Boston. This illustrates that cell line authentication by STR profiling is critical for valid research.
- In the Korch Profiler Plus there are three STR profiles that match HeLa at 81-88% similarity. Two of the samples are labeled as HeLa and one is PC-3, which has been shown to be a derivative of HeLa.
- In the Lorenzi et al. Identifier database there are five samples with profiles that match the STR profile of your sample from HeLa cells: One is HeLa and the 4 other sample are shown by Chen et al. (2008) to actually be HeLa and not of their purported origin.
- In the Masters et al. database there are at least 10 STR profiles that match the STR profile of your sample of HeLa cells at 100% identity for those loci tested in common. Several of the samples have names other than HeLa, but they are all known to be HeLa derivatives that have arisen by cross-contamination (e.g., Intestine 407). There are close to 100 cell lines with different names that are actually HeLa cells due to having been cross-contaminated at an early stage in their development.
- In the Consolidated DSMZ database, the STR profile of your sample of HeLa matches that of at least 65 samples of HeLa and its various derivatives in the database from the various cell line repositories
- The HeLa profile of your sample did not have matches in the Minna-Gazdar dataset, because they do not have HeLa cells in their collection of cell lines.

Conclusion

- **The STR profile of your sample of HeLa cells clearly shows that it is an authentic sample of this cell line.**

DP0297-04 SiHa, unknown passage number

- The STR DNA profile of your sample of the SiHa cell line matches only itself in the Korch Identifier database.
- In the Consolidated DSMZ database, the SiHa profile that we determined matches that of one sample of SiHa from the ATCC [HTB-35] at 100% identity for the alleles at the loci that were tested in common.
- There are an additional two cell lines listed in the Consolidated DSMZ database that have 90% similarity to your SiHa STR profile. These are highlighted in grey with the differences between them and the SiHa profile highlighted in magenta/red. Generally, 80% or higher similarity is considered to indicate a match; however, these are not matches!
 - The reason the STR profiles have a similarity score greater than 80% is that the heterozygosity index of SiHa is quite low (6 of 15 loci are heterozygous). This results in an apparent match to the true SiHa cell line profiles. If you examine several of the loci, you will see that these lines have extra alleles that the true Ca Ski samples do not have.
- The SiHa profile of your sample did not have matches in any of the other databases of profiles: Korch Profiler Plus, Lorenzi and others Identifier, the Masters et al. dataset, and the Minna-Gazdar dataset.

Conclusion

- **The SiHa profile shows that it is most an authentic sample of this cell line that the ATCC has in its repository.**

OVERALL CONCLUSIONS

See beginning of report.

Please remember to cite Christopher Korch and Robert Shelton for this work that was performed at the University of Colorado DNA Sequencing & Analysis Core. This citation by you is critical for documentation of the core's performance and demonstration of its utility to the endeavors of the research community.

Sincerely,



Christopher Korch, PhD
Former Director

RJS (signed by CTK)

Robert Shelton, M Sc
Manager

Address: University of Colorado DNA Sequencing & Analysis Core
University of Colorado School of Medicine
RC-1 South, Room L18-8400,
12801 East 17th Avenue, Mailstop 8117
Aurora, CO 80045

Telephone: (303) 724-3164 (direct) Fax: (303) 724-3889
Email: Christopher.Korch@uchsc.edu



GOBIERNO DE
MÉXICO

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional
de Cancerología

CARTA PODER

LIC. ROCÍO SALDAÑA HERNÁNDEZ, promoviendo como apoderada legal del INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INCAN), como lo demuestro con la copia certificada del INSTRUMENTO NOTARIAL, numero treinta y ocho mil novecientos treinta y dos, pasado ante la Fe del público, número doce, Lic. Fernando Perez Arredondo, de la Ciudad de México, señalando como domicilio para oír y recibir toda clase de notificaciones en la Subdirección de Asuntos Jurídicos, que se encuentra en el segundo piso del edificio de Administración, ubicada en avenida San Fernando número dos, puerta uno, colonia Barrio del Niño Jesús, alcaldía Tlalpan, C.P. 14080 en esta Ciudad de México, con correo electrónico rsaldanah@incan.edu.mx. Por medio del presente ocurso y en ejercicio de las facultades de otorgar y revocar poderes que expresamente me fueron conferidas en el poder mencionado, AUTORIZO indistintamente a:

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ

DRA. SARA OFELIA MATA MORALES

Como personas CON PODERES para ingresar solicitudes, recoger toda clase de documentos y oficios, para que puedan oír y recibir toda clase de notificaciones, consultar expedientes, así como para intervenir en cualquier diligencia ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI).

Se firma la presente en la Ciudad de México, a los 18 días del mes de noviembre del 2019.

Lic. Rocío Saldaña Hernández
APODERADA

TESTIGO 1

Lucía Guadalupe Tapia Pacheco

TESTIGO 2

Dr. David Francisco Cantú de León

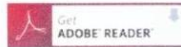


ICGEB DNA Tumour Virus Meeting

9-14 July 2019 - Trieste, Italy

50th
ANNIVERSARY

ABSTRACT SUBMISSION



To be sent by e-mail to ICGEB Meetings & Courses Unit
DNATV2019Secretariat@icgeb.org
by 4th April 2019

***Presenting Author** ALEJANDRO GARCIA-CARRANCA

MUST BE REGISTERED

Institute Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Cancerología,

***E-mail** carranca@biomedicas.unam.mx

please indicate preference:

- Poster
 Oral (*)

please indicate session:

- Transformation
 Gene Expression
 Replication
 Viral Pathogenesis / Therapy
 Cell Growth / DNA Damage Response
 Virus Host Interactions
 Virions / Viral Entry / Life Cycle

Format: TEXT will NOT be re-typed or edited

- Max 2,500 characters (exceeding text automatically omitted)
- Preferred font Arial 10
- Do not use ALL CAPS, except for scientific definitions; single-line spacing, justified, no line between paragraphs

Title CDH1 and SNAI1 are regulated by E7 from Human Papillomavirus types 16 and 18
(max. 180 characters)

Author(s) Pedro Rosendo-Chalma, Verónica Antonio-Vejar, Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez, Carlos César Patiño-Morales, Amparo Cano-García and Alejandro García-Carranca
(max. 250 characters)

Affiliations Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. Laboratorio de Biomedicina Molecular, UA de Guerrero, Departamento de Bioquímica, UA de Madrid & CIBERONC,
(max. 250 characters)

Abstract text

A common characteristic of cancers associated with viruses is the deregulated expression of the CDH1 (E-cadherin) gene, in general by activation of DNA methyltransferases (Dnmts). The E7 protein from High Risk Human Papillomaviruses (HR-HPV) has been shown to interact with Dnmt1 and Histone Deacetylase type 1 (HDAC1). We propose that E7 can regulate the expression of CDH1 through two pathways: a) by epigenetic mechanisms including DNA methylation, and b) by epigenetic-independent mechanisms that include induction of negative regulators of CDH1 expression, such as Snai1 and Snai2. To test our hypothesis, we used HPV16- and HPV-18- positive cell lines and determine the methylation pattern of the CDH1 promoter and its expression in relation with its negative regulators. We found very different methylation frequencies in the CDH1 promoter between HeLa (88.24%), compared to SiHa (17.65%), or Ca Ski cell lines (0%). Significant differences in expression of SNAI1 were observed between these cell lines that inversely correlate with expression of CDH1. In addition, we observed that suppressing E7 not only increases the expression of CDH1, but surprisingly decreases the expression of SNAI1 and modifies the methylation pattern of the CDH1 promoter. These results suggest that expression of CDH1 is dependent on the expression of SNAI1 and inversely correlated with expression of E7. Our results allow us to conclude that E7 from HPV 16/18 can regulate the expression of CDH1 by two different pathways in which Snai1 is involved: a) by hypermethylation of the CDH1 promoter region and expression of SNAI1 as observed in HeLa cell line, and b) by hypomethylation of the CDH1 promoter region and expression of SNAI1, as observed in SiHa cell line. Where the expression of SNAI1 in both cases could be considered as a potential biomarker of metastasis.

(*PLEASE NOTE: All talks will be loaded onto the meeting computer for presentation and deleted after the session. Personal computers/laptops cannot be used.

M&C_Unit_DNATV2019

Comunidad de Madrid, 20 de noviembre del 2020.

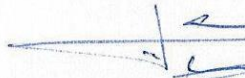
Por el presente se otorga a: Dña. **ROCÍO SALDAÑA HERNÁNDEZ** y/o D. **ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ** y/o Dña. **SARA OFELIA MATA MORALES**, lo siguiente:

Poder amplio, suficiente y bastante para que conjunta o separadamente y en nuestro nombre y representación, **procedan a representarnos en toda clase de asuntos en materia de propiedad industrial e intelectual** ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) en México u Oficinas Autorizadas de propiedad industrial de otros países, referente a la invención denominada "**CDH1 Y SNAI1 COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y TRATAMIENTO DE UN CÁNCER CON POTENCIAL METASTÁSICO ASOCIADO A VIRUS DE PAPILOMA HUMANO**", la cual, es objeto de una solicitud de patente en **COAUTORÍA** entre esta Universidad y el Instituto Nacional de Cancerología en México.

Para presentar, tramitar u obtener declaraciones administrativas de cualquier clase en beneficio de nuestros intereses, así como para desistirse de ellas; para presentar demandas y denuncias de todo tipo, apelaciones, reconsideraciones y recursos, así como para desistirse de los mismos; para celebrar convenios y en general para llevar a cabo cualquier acto ante Autoridades Administrativas y Judiciales Mexicanas, ya sea, federales y locales, así como ante organismos nacionales e internacionales que puedan ser necesarios para la conservación de nuestros derechos en materia de propiedad industrial e intelectual, por lo cual se les autoriza para llevar a cabo todas las medidas que consideren convenientes para los fines señalados.

El que suscribe, D. JAVIER ORTEGA GARCÍA, Vicerrector de Innovación, Transferencia y Tecnología, le fue concedida la autoridad para ejecutar el presente documento actuando en nombre y representación de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (UAM), en virtud de las competencias que tengo atribuidas en la Resolución de 16 diciembre de 2019 del Rector de la Universidad Autónoma de Madrid (BOCM nº5, de 7 de enero de 2020).

APODERADO



JAVIER ORTEGA GARCÍA

Vicerrector de Innovación, Transferencia y
Tecnología de la UAM



TESTIGO 1



Ana Méndez

Técnico de protección de resultados de
investigación CAITEC

TESTIGO 2



Iván Manzanares

Director Técnico del CAITEC

XVI. ANEXO III - Coautor en artículo científico publicado en Oral Diseases.

Received: 7 August 2017 | Accepted: 9 August 2017

DOI: 10.1111/odi.12732

PROF SCULLY MEMORIAL ISSUE

WILEY ORAL DISEASES

Human papillomavirus load in benign HPV-associated oral lesions from HIV/AIDS individuals

S Camacho-Aguilar¹ | V Ramírez-Amador¹ | P Rosendo-Chalma² | M Guido-Jiménez² | A García-Carrancá² | G Anaya-Saavedra¹¹Oral Pathology and Medicine Postgraduate Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico²Biomedical Research Unit, Instituto Nacional de Cancerología (INCan)/Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

Correspondence

Gabriela Anaya Saavedra, Oral Pathology and Medicine Postgraduate Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Coyoacan, Mexico City, Mexico.
Emails: iganaya@correo.xoc.uam.mx; gabyanaya@hotmail.com**Background:** Although HPV emerged as a crucial carcinogenic and prognostic biomarker in head and neck cancer, and considering the increase in HPV-associated oral lesions (HPV-OLs) in HIV individuals, molecular information about HPV-OLs is scarce; thus, our aim was to determine viral loads in HPV-OLs from HIV/AIDS individuals.**Methods:** HIV/AIDS subjects with HPV-OL were included in this cross-sectional study. Following informed consent, biopsies were obtained. HPV detection and typing were carried out by PCR and sequencing (MY09/11, GP5+/6+). HPV-13 and HPV-32 loads were determined by a high-resolution melting assay. For statistical analysis, χ^2 , Fisher's exact, and Mann-Whitney *U* tests were applied, using SPSS software (v.23).**Results:** Twenty-nine HIV subjects (median age 38 years, 93% males) were included. Most were AIDS individuals (72.4%) under HAART (89.7%). Twenty-two (75.9%) participants had more than one HPV-OL (four with florid presentations), mostly multifocal epithelial hyperplasia (62%), being HPV-13 (26%) and HPV-32 (31%) the most frequent types. HPV load was higher in individuals with multiple HPV-OLs than in solitary lesions (4.9 vs. 3.2 Log₁₀ copies/ml, *p* = .090) and in HPV-32⁺ than in HPV-13⁺ (8.3 vs. 6.4 Log₁₀ copies/ml, *p* = .014).**Conclusions:** Multiple HPV-OLs showed high HPV loads, possibly indicating transcriptional activity of the virus; however, in the HIV setting, the individual and local immunological response could be the key process.

KEYWORDS

HIV/AIDS, HPV, oral cancer, oral lesions, viral load

1 | BACKGROUND

Recent studies have demonstrated that HPV load influences significantly the severity, progression, recurrence, and survival of women affected with cervical cancer, independently of the therapeutic approaches used (Cao et al., 2016; Deng, Feng, Zheng, Huang, & Liu, 2015). In contrast, few studies (Herberhold et al., 2017; Lorenzi et al., 2017) have shown the value of HPV load as a biomarker in head and neck pathology. Recently, a longitudinal study (Lorenzi et al., 2017) proved that high HPV-16 load is a risk factor for viral persistence and could predict viral integration, a key factor for oncogenesis.

In patients with HIV/AIDS, the so-called benign HPV-related oral lesions (HPV-OLs) represent an interesting knowledge area that deserves further investigation. In comparison with their presentation among immunocompetent patients, HPV-OLs show clinical, histopathological, and molecular characteristics that place them as intriguing entities in the HIV context (Limeres Posse & Scully, 2016; Patton et al., 2013). Besides their diverse clinical and pathological appearances and behavior, including recalcitrant cases with florid presentation, resistant to conventional therapies (Baccaglini et al., 2007), HPV-OLs also exhibit a diversity of viral types (Anaya-Saavedra et al., 2013; Patton et al., 2013).

© 2018 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved

210 | wileyonlinelibrary.com/journal/odi

Oral Diseases. 2018;24:210–214.

Furthermore, taking into consideration the increased risk to oral and oropharyngeal cancer among patients with HIV/AIDS, as well as the importance of HPV as both oncogenic and prognostic biomarkers (Huang et al., 2015), it is clear that there is a compelling need to expand the HPV knowledge in the HIV context. The aim of this study was to determine the HPV viral load of the most prevalent types identified in HPV-OLs from HIV/AIDS individuals and its probable association with clinical parameters.

2 | METHODS

This cross-sectional study was conducted in HIV-infected subjects with HPV-OLs, from an ongoing cohort followed at the Oral Pathology and Medicine Clinics located at the three main HIV/AIDS-referral centers in Mexico City (September 2013–December 2014). The study was approved by the Institutional Committee of UAM (approval number 9/17-7.1) and followed the STROBE group recommendations (http://www.strobe-statement.org). Exclusion criteria considered the administration (<6 months) of systemic or topical drugs, which could modify our main outcome (5-fluorouracil, imiquimod, cidofovir, acyclovir, or interferon-α). A written informed consent was obtained from all individuals, and demographic and clinical information was registered. A biopsy sample and histopathological analysis were performed to confirm the diagnosis and for therapeutic purposes; after that, DNA was extracted from the paraffin-embedded blocks using the QIAmp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany), quantified, and purified as previously described (Anaya-Saavedra et al., 2013). DNA integrity from biopsies was determined by PCR using GAPDH as control (Figure 1a); for detection of HPV by PCR, we used MY09/11 primers that amplify an L1-HPV region, followed by a nested PCR using primers GP5+/6+ (Figure 1b). The GP5+/6+-PCR-positive amplicons were purified by

the Exo-SAP method for sequencing using BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); the obtained sequences were matched and compared using the BLAST program (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) for genotyping (Figure 1c,d). To determine HPV viral load, pCR-HPV-13 and pCR-HPV-32 recombinant plasmids were constructed using the TOPO TA cloning system of Invitrogen (Life Technologies, USA); HPV-13 primers (Fwd 5'-TGCAGTGGAAATCCTTATTTT-3' and Rev 5'-GCCCACTAAGCGTTGACT-3') and HPV-32 primers (Fwd 5'-TGCCAGCAGTTCTAGGCTTT-3' and Rev 5'-CAACC TCCAAACCCACACA-3') were designed considering highly conserved sequences of the L1 region. The recombinant plasmids were linearized by PstI digestion, and according to the Avogadro's number calculation, a standard curve was prepared, in which HPV-13 and HPV-32 genomes were present at 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, and 10¹⁰ viral copies; then, absolute numbers were Log₁₀ transformed. HPV-DNA viral load was determined by high-resolution melting (HRM) using the HPV-13- and HPV-32-specific primers (Figure 2a,d). For statistical analysis, continuous variables were summarized by medians and its interquartile intervals (Q₁–Q₃, percentiles 25th–75th), and by percentages on qualitative variables. Bivariate associations were evaluated by X² and Fisher's exact tests, when necessary. Nonparametric distributions were analyzed through the Mann-Whitney U test. Statistical analysis was carried out using SPSS program (v.23, IBM Corp., Armonk, NY, USA), considering p values <5% statistically significant.

3 | RESULTS

Twenty-nine HIV individuals (median age 38 [Q₁–Q₃: 29–45] years, 93% males) with HPV-OL were included. Twenty participants (69%) were heavy tobacco users and 18 (62%) regular alcohol consumers. Most individuals were infected with HIV (21/72.4%) and received

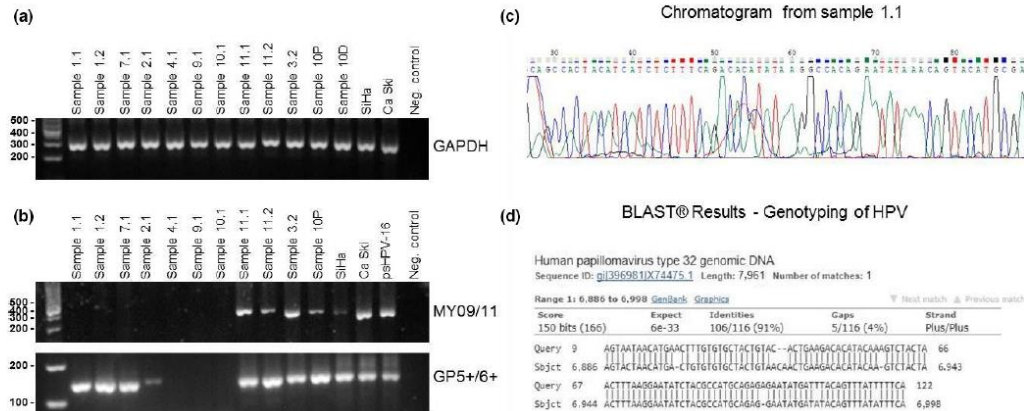


FIGURE 1 Detection and typing of HPV by nested PCR with the MY09/11 and GP5+/6+ primer sets and sequencing. (a) DNA integrity was determined by PCR for GAPDH gene amplification (305 bp). (b) HPV-DNA detection by nested PCR using MY09/11 (450 bp) and GP5+/6+ (150 bp) primers. DNA from the cell lines SiHa, Ca Ski, and psHPV16 was used as positive controls; a mix-PCR without DNA was used as negative control. (c) and (d) Sequencing and typing of HPV by BLAST® from NCBI

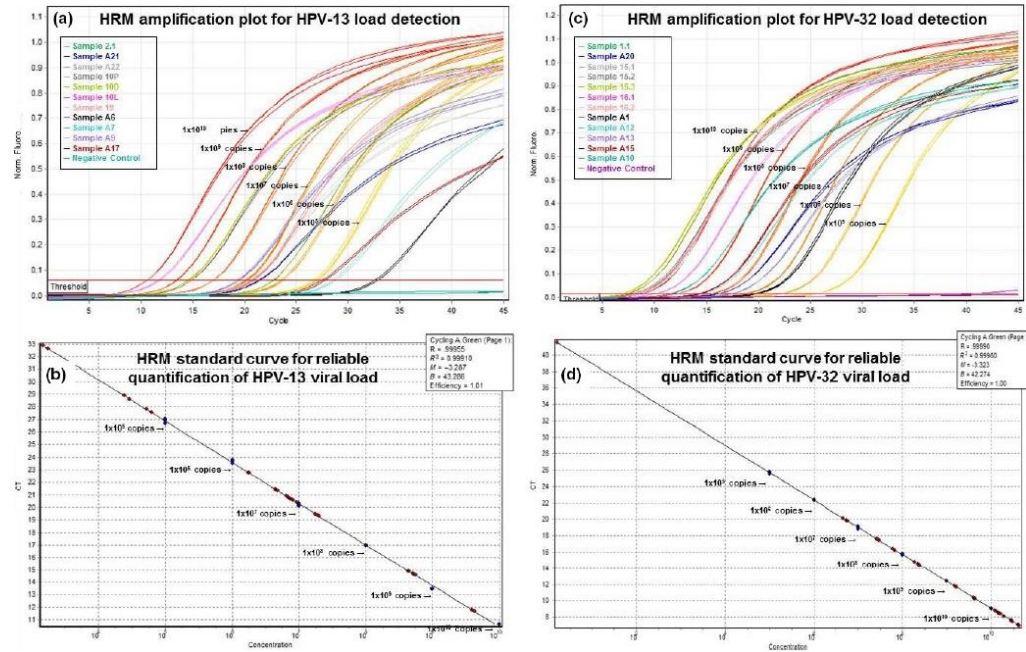


FIGURE 2 High-resolution melting (HRM) for human papillomavirus (HPV) viral load assay. (a) and (c) amplification plots obtained by HRM for six-point series concentration (10^5 – 10^{10} number of viral copies) of HPV-13 and HPV-32 plasmid DNA and for clinical samples, respectively. The x-axis denotes the cycle number, and y-axis denotes the fluorescence intensity over the background. (b) and (d) Comparison of standard curves for the crossing points plotted against the HPV-13 and HPV-32 concentrations, respectively. The x-axis denotes the series concentration of HPV-13 and HPV-32; y-axis denotes the cycle number

HAART (26/89.7%), with a median time of use of 31.5 (Q_1 – Q_3 : 9–100) months. The median lymphocyte CD4⁺ count was 349 (192–547) cells/mm³, and 18 of the 29 participants (62%) had undetectable levels of RNA-HIV viral load.

The most common HPV-OL was multifocal epithelial hyperplasia (18/29, 62%). Seven individuals presented solitary lesions (24%), with verruca vulgaris being the most frequent (4/7). Twenty-two subjects (75.9%) presented multiple (>1 HPV-OL), and four of them exhibited a florid presentation (Figure 3). No associations between solitary/multiple lesions and tobacco use, alcohol consumption, clinical stage, CD4⁺ counts, or HIV viral load were found.

Forty-two HPV-OLs tissue samples were obtained from the 29 participants, identifying 11 different HPV types, with HPV-32 being the most prevalent (31%), followed by HPV-13 (26%), HPV-6 (19%), and HPV-72 (10%). Other types identified were HPV-16 (5%), HPV-11 (5%), and HPV-81 (5%). Interestingly, HPV-13 was identified in patients with more years since HIV diagnosis (11 vs. 5.5 years, $p = .69$) and higher CD4⁺ (553 vs. 305 cel/ μ l); nonetheless, the differences were not significant.

Sixteen samples carrying HPV-32 and HPV-13 were selected for HPV viral load analysis, and the median Log₁₀ HPV load was 7.36

(Q_1 – Q_3 : 6.45–8.32) copies/ml. Samples harboring HPV-32 had significantly higher levels of viral DNA (8.3, Q_1 – Q_3 : 7.5–9.5) than those with HPV-13 (6.4, Q_1 – Q_3 : 4.5–7.2) ($p = .014$). While no statistical differences were found, the Log₁₀ median HPV load was slightly higher in patients who exhibited multiple HPV-OLs than in those with solitary lesions (4.93 vs. 3.19 copies/ml, $p = .090$).

4 | DISCUSSION

This report describes for the first time the quantitative measurement of viral HPV-DNA in HPV-OLs from patients with HIV/AIDS, a potential biomarker of major importance in the HIV setting, as HPV load is nowadays considered a type-dependent risk marker of oncogenesis and prognosis.

The HPV types mostly identified and later analyzed (13 & 32), as in most reports (Anaya-Saavedra et al., 2013; Gültekin, Tokman Yildirim, & Sarisoy, 2011; Syrjänen, 2003), agree with the types described in most oral HPV lesions. Although a low proportion of our samples harbored HPV-16, the exact role of high-risk types on benign oral warts from HIV-infected patients remains unclear and deserves close

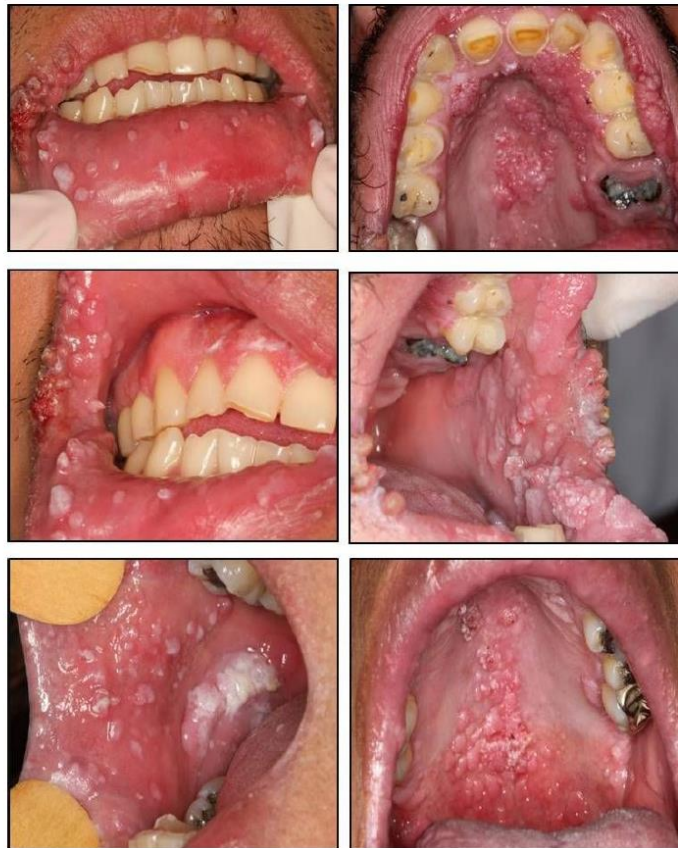


FIGURE 3 Demonstrative images of HPV-OL florid presentation in two individuals. Multiple and coalescent squamous cell papilloma, verruca vulgaris, and multifocal epithelial hyperplasia lesions affecting almost all oral mucosa from two HIV individuals starting highly active antiretroviral therapy

monitoring. Moreover, at present, information about the physical state of high-risk DNA-HPV from HPV-OL is required.

Although HPV load did not show statistical differences with clinical characteristics, one of the main findings in the present study was the high HPV load found in multiple HPV-OL, including florid cases. This could possibly be a consequence of the increased HPV replication and transcriptional activity in patients with immune deterioration; however, the small number of patients with florid appearances did not allow us to seek for further associations. It is possible that the altered immunological response in long-term HIV-treated patients constitutes a key factor in HPV-OL development; thus, it is essential to investigate the role of local and individual immune responses in the oral mucosa of HIV individuals.

The main limitations of our study are the cross-sectional design and the low sample size, particularly among HPV-OL florid cases. A proper description of the onset and behavior of HPV-OLs in HIV-infected patients through longitudinal studies could provide additional information; moreover, a prospective design is essential to elucidate whether HPV-OLs are part of immune restoration inflammatory

syndrome (IRIS) (Wong, Richards, Pei, & Sereti, 2016), as genital and anal warts are currently recognized as manifestations of IRIS (Iarikov, Duke, & Skiest, 2008; Meys et al., 2011).

In addition, although there are few reports of successful therapies with topical agents like imiquimod (Méndez-Flores, Esquivel-Pedraza, Hernández-Salazar, Charli-Joseph, & Saeb-Lima, 2016), there is no evidence based on double-blind, placebo-controlled randomized clinical trials, which allow us to properly treat these lesions. This issue is significant taking into consideration the recent evidence of psoriasiform skin inflammation after ingestion of topical imiquimod in mice (Grine et al., 2016), previously reported in children (Smith, Siegel, Lyon, & Holland, 2013), information that warrants the development of well-designed clinical trials.

In conclusion, considering the relatively high HPV load found in multiple HPV-OLs, as well as the potential risk of HPV carcinogenesis in the HIV setting, our findings provide more data to reinforce the need of prophylactic HPV vaccination in populations with an increased risk of HPV-related diseases (Bonanni et al., 2015), beyond the universal coverage of primary and secondary target groups recommendations (WHO, 2017).

CONFLICT OF INTEREST

None to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Selik Camacho-Aguilar participated in clinical and experimental procedures and data analysis; Pedro Rosendo-Chalma and Miriam Guido-Jiménez participated in experimental assays and paper draft, Gabriela Anaya-Saavedra, Velia Ramírez-Amador, and Alejandro García Carrancá participated in the conception and design of the study, clinical and experimental procedures, data analysis, and paper draft.

REFERENCES

- Anaya-Saavedra, G., Flores-Moreno, B., García-Carrancá, A., Irigoyen-Camacho, E., Guido-Jiménez, M., & Ramírez-Amador, V. (2013). HPV oral lesions in HIV-infected patients: The impact of long-term HAART. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 42, 443–449.
- Baccaglioni, L., Atkinson, J. C., Patton, L. L., Glick, M., Ficarra, G., & Peterson, D. E. (2007). Management of oral lesions in HIV-positive patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 103, e1–e23. S50.
- Bonanni, P., Bechini, A., Donato, R., Capei, R., Sacco, C., Levi, M., & Boccalini, S. (2015). Human papilloma virus vaccination: Impact and recommendations across the world. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 3, 3–12.
- Cao, M., Shah, W., Qi, J., Zhou, Y., Wang, Y., & Chen, H. (2016). Prognostic significance of human papillomavirus viral load in correlation with different therapeutic modalities in cervical cancer patients. *Pathology, Research and Practice*, 212, 804–810.
- Deng, T., Feng, Y., Zheng, J., Huang, Q., & Liu, J. (2015). Low initial human papillomavirus viral load may indicate worse prognosis in patients with cervical carcinoma treated with surgery. *Journal of Gynecologic Oncology*, 26, 111–117.
- Grine, L., Steeland, S., Van Ryckeghem, S., Ballegeer, M., Lienenklaus, S., Weiss, S., ... Libert, C. (2016). Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. *Scientific Reports*, 28, 20134.
- Gültekin, S. E., Tokman Yildirim, B., & Sariso, S. (2011). Oral focal epithelial hyperplasia: Report of 3 cases with human papillomavirus DNA sequencing analysis. *Pediatric Dentistry*, 33, 522–524.
- Herberhold, S., Hellmich, M., Panning, M., Bartok, E., Silling, S., Akgül, B., & Wieland, U. (2017). Human polyomavirus and human papillomavirus prevalence and viral load in non-malignant tonsillar tissue and tonsillar carcinoma. *Medical Microbiology and Immunology*, 206, 93–103.
- Huang, S. H., Xu, W., Waldron, J., Siu, L., Shen, X., Tong, L., ... O'Sullivan, B. (2015). Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 836–845.
- Iarikov, D., Duke, W., & Skiest, D. (2008). Extensive development of flat warts as a cutaneous manifestation of immune reconstitution syndrome. *AIDS Read*, 18, 524–527.
- Límeres Posse, J., & Scully, C. (2016). Images in clinical medicine. Oral HPV-Associated Papillomatosis in AIDS. *New England Journal of Medicine*, 374, 2585.
- Lorenzi, A., Rautava, J., Kero, K., Syrjänen, K., Longatto-Filho, A., Grenman, S., & Syrjänen, S. (2017). Physical state and copy numbers of HPV16 in oral asymptomatic infections that persisted or cleared during the 6-year follow-up. *Journal of General Virology*, 98, 681–689.
- Méndez-Flores, S., Esquivel-Pedraza, L., Hernández-Salazar, A., Charli-Joseph, Y., & Saeb-Lima, M. (2016). Focal Epithelial Hyperplasia in Adult Patients With HIV Infection: Clearance With Topical Imiquimod. *Skinmed*, 14, 395–397.
- Meys, R., Macedo, C., Jones, R., Day, S., Weir, J., Gotch, F. M., & Bunker, C. B. (2011). Cutaneous human papillomavirus-related immune reconstitution-associated disease in human immunodeficiency virus: An under-recognized phenomenon. *British Journal of Dermatology*, 164, 458–459.
- Patton, L. L., Ramirez-Amador, V., Anaya-Saavedra, G., Nittayananta, W., Carrozzo, M., & Ranganathan, K. (2013). Urban legends series: Oral manifestations of HIV infection. *Oral Diseases*, 19, 533–550.
- Smith, W. A., Siegel, D., Lyon, V. B., & Holland, K. E. (2013). Psoriasisiform eruption and oral ulcerations as adverse effects of topical 5% imiquimod treatment in children: A report of four cases. *Pediatric Dermatology*, 30, 157–160.
- Syrjänen, S. (2003). Human papillomavirus infections and oral tumors. *Medical Microbiology and Immunology*, 192, 123–128.
- Wong, C. S., Richards, E. S., Pei, L., & Sereti, I. (2016). Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV infection: Taking the bad with the good. *Oral Diseases*, <https://doi.org/10.1111/odi.12606>
- World Health Organization (2017). Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017- Recommendations. *Vaccine*, 410, 30728–30734.

How to cite this article: Camacho-Aguilar S, Ramirez-Amador V, Rosendo-Chalma P, Guido-Jiménez M, García-Carrancá A, Anaya-Saavedra G. Human papillomavirus load in benign HPV-associated oral lesions from HIV/AIDS individuals. *Oral Dis*. 2018;24:210–214. <https://doi.org/10.1111/odi.12732>

XVII. ANEXO IV - Coautor en artículo científico publicado en BMC Cancer.

Bigoni-Ordóñez et al. *BMC Cancer* (2018) 18:928
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4824-5>

BMC Cancer

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Molecular iodine inhibits the expression of stemness markers on cancer stem-like cells of established cell lines derived from cervical cancer

Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez^{1,2}, Elizabeth Ortiz-Sánchez¹, Pedro Rosendo-Chalma^{1,3}, Heriberto A Valencia-González^{1,2}, Carmen Aceves^{4*} and Alejandro García-Carrancá^{1,5*} 

Abstract

Background: Cancer stem cells (CSC) are characterized by deregulated self-renewal, tumorigenicity, metastatic potential, aberrant stemness signaling pathways, resistance to conventional therapy, and the ability to give rise to a progeny of proliferating cells that constitute the bulk of tumors. Targeting CSC will provide novel treatments for cancer. Different investigations have focused on developing complementary approaches that involve natural compounds that decrease chemo-resistance and reduce the side effects of conventional therapies. Since, it has been reported that molecular iodine (I₂) exhibits antineoplastic effects and decreases tumor progression in some cancer models, we evaluated the potential effect of I₂ on cell cultures enriched in cervical cancer stem-like cells.

Methods: HeLa and SiHa cervical cancer cells were treated with 200μM I₂ for 24 h. After time, cells were cultured in CSC-conditioned medium (cervospheres) and viability assays were performed. Following, tumorigenic capabilities in cervospheres treated with I₂ were evaluated in NOD/SCID mice. HeLa monolayer cells untreated and their respective cervosphere cells treated or untreated with 200 μM of I₂ for 24 h were xenotransplanted subcutaneously at different amounts and mice were monitored for at least 2 months.

Results: In the present study, monolayer and CSC-enriched cultures (cervospheres) from cervical cancer-derived cell lines, HeLa and SiHa, showed that 200μM I₂ supplementation inhibits proliferation of both and decreased their tumorigenic capacity, in vivo. This antineoplastic effect of I₂ was accompanied by diminished expression of stemness markers including CD49f, CK17, OCT-4, NANOG, SOX2, and KLF4, as well as increased expression and activation of PPARγ receptors.

Conclusions: All this data led us to suggest a clinical potential use of I₂ for targeting CSC and improve current treatments against cervical cancer.

Keywords: Molecular iodine, Cervical cancer stem cells, Stemness markers, PPAR gamma

* Correspondence: caracev@unam.mx; carranca@biomedicas.unam.mx

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Campus-Juriquilla, Querétaro 76230, Qro, Mexico

³División de Investigación Básica, Laboratory of Virus and Cancer, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Av. San Fernando No. 22, Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CP, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

In 2012, cancer caused 8.2 million deaths with 14.1 million new cases with a higher prevalence in men than in women. Cervical cancer is the 4th most common cancer in women with an estimated of 528,000 new cases in 2012 and 266,000 deaths. According to the data, the mortality in Mexico for cancer in 2012 was 40,053, with cervical cancer responsible for 11.9% of those deaths [1].

High-risk human papillomaviruses (HPV) are related for the development of cervical cancer [2]. This is achieved through the persistent infection of HPV until later integrates his viral DNA into the host cell. The oncogenic potential of HPV resides in their oncoproteins E6 and E7 that disrupt the cell cycle control. The E6 function of high-risk HPV types is the binding and targeting of p53 for degradation and the function of E7 is binding the retinoblastoma tumor suppressor protein (pRb) for degradation allowing the release of the transcription factor (EF2) that promotes the expression of numerous genes that control DNA synthesis and cell proliferation [3, 4].

Tumors exhibit a high degree of cellular heterogeneity, and we now believe that only certain cells, known as cancer stem cells (CSC), have the ability to maintain the growth of the tumor mass and the capacity to invade other tissues. The proportion of CSC is variable depending on tumor type and stage [5, 6]. CSCs are undifferentiated cells that have the capacity for self-renewal, chemo-radiation resistance, promoting metastasis and cancer recurrence [7–9]. The presence of CSC has been shown in several types of cancers, such as breast, colon, brain and many others, as identified using the expression of various markers [10–14]. The presence of cervical cancer stem cells (CCSC) has been determined through the expression of CD49f and cytokeratin 17 (CK17) [15, 16].

CD49f, also known as alpha 6 integrin, belongs to the alpha family of integrins and is found on the cell membrane. CD49f has been used as an epithelial stem marker in the human epidermis [17], as an important marker for enrichment of cancer stem cells [18], and described as a target during HPV binding to initiate an intracellular signaling cascade for virus entry [19]. Cytokeratins are proteins that are part of epithelial cells, and their expression depends on the degree of differentiation they acquire. Keratin expression in cervical tissue has been well defined, and it was observed that sub-columnar reserve cells, where the stem cell population of the uterine cervix is found, showed specific expression of CK17 [20]. Identification and characterization of cancer stem cell-like cells from primary carcinomas of the cervix uteri found expression of CK17 [21], suggesting that cells expressing this cytokeratin also as a target of HPV [22]. Our group has previously shown expression of CD49f and CK17 as possible markers for CCSC and that sphere cultures

(cervospheres) are enriched in CCSC showing high tumorigenic in vivo assays compared to their counterparts grown as monolayers [15, 16].

Self-renewal and pluripotency are maintained by the expression of Oct4, Sox2, Klf4, and Nanog on embryonic stem (ES) cells [23–26]. There is evidence that these stemness genes are relevant for tumor transformation, metastasis, and tumorigenicity in human malignancies [27–29]. In clinical terms, chemo and radio-therapy are the gold standard for the treatment of cervical cancer in advanced stages. Depending on the stage of the tumor, the rate of recurrent disease and inefficient treatments could be due to the presence of drug-resistant CSC. For these reasons, different investigations have focused on developing complementary approaches that involve natural compounds that decrease chemo-resistance and reduce the toxic effects of conventional therapies. I₂ exerts significant antineoplastic effects on several types of cancer and multiple mechanisms could mediate its actions. Among these, I₂ can react with arachidonic acid generating the iodolipid called 6-iodolactone (6-IL), which has been confirmed to be an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma (PPAR γ). The activation of these receptors decreases the expression of specific markers associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition [30–34]. Previous studies from our laboratory showed that I₂ impairs chemo-resistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of chemo-resistance markers p21, Bcl-2 and MDR-1 in chemo-resistant MCF-7 cells [35]. In the present work, we showed that in cultures growing as monolayers or cervospheres of HeLa and SiHa cell lines derived from cervical cancer, I₂ was able to inhibit proliferation and the ability to form tumors in mice. This effect includes a decrease in expression of CD49f and CK17 putative stem cell markers and stem transcription factors OCT-4, SOX2, KLF4, NANOG. We propose that in this model, the action of I₂ could be through the activation of the PPAR gamma receptors.

Methods

Cell culture and I₂

Human CC cell lines, HeLa (ATCC@-CRM-CCL-2 T, adenocarcinoma, HPV-18) and SiHa (ATCC@-HTB-35, squamous cell carcinoma, HPV-16), were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Monolayer culture cells were seeded (500,000 cells) in 100 mm cell culture dishes (Corning, Inc., Corning, NY, USA) in 7 mL of medium, grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in DMEM media (Gibco®) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Molecular iodine was

prepared with 13 g of crystalline iodine (Macron-Avantor, Center Valley, PA, USA) and 60 g of potassium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in one liter of ddH₂O. The iodine concentration was confirmed by titration with a solution of 0.1 N sodium thiosulfate. The use of all cell lines and cell cultures were approved by Research and Bioethics Committees of Instituto Nacional de Cancerología [Prot. No. 018/012/IBI] (CEI/1096/17), Dated 03.02.2018].

Cervospheres

For the formation of cervospheres derived from CC cell lines, monolayer cell cultures were grown to 70–80% confluence and then harvested, counted, and washed with Phosphate buffer solution (PBS) to remove the remainder of FBS. After that, cells were cultured in DMEM F12 media (Gibco®) supplemented with 20 ng/mL epidermal growth factor (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), 20 ng/mL basic fibroblast growth factor (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), 10 µg/mL B27 (50X, Gibco®) and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a density of 3×10^3 cells/ml in 100 mm ultra-low adherence dishes of (Corning, Inc., Corning, NY, USA). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 3 days and cervosphere formation was monitored daily.

Molecular iodine treatments

The I₂ was previously diluted in culture medium and then added to the cells. The monolayers and spheres cultures of SiHa and HeLa cell lines were treated at a concentration of 200 µM of I₂ for 24 h. After time, cultures were collected and processed for the corresponding tests.

Analysis of markers by flow cytometry

Monolayers and cervospheres treated or untreated with 200 µM of I₂ for 24 h were collected separately and placed in a tube where they were allowed to remain for 15 min. After that time, supernatant was removed and the bottom cells were washed with PBS and spun down at 500 g ($r = 11$ cm) for 5 min at room temperature. Supernatant was removed and cells were resuspended in flow buffer (PBS 1X, 0.05% BSA) and disaggregated by mechanic pipetting. Before incubation with anti-CK17, anti-OCT-4, anti-SOX2, anti-NANOG, and anti-KLF4 antibodies, cells were permeabilized by incubation with methanol for 15 min on ice. Then, cells were washed and incubated with primary antibody. For each primary antibody, 5×10^5 cells were incubated with anti-CD49f-PE (BD Bioscience, CA, USA), anti-CK17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), anti-OCT-4-AlexaFluor488, anti-SOX2-AlexaFluor488 (both BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), anti-NANOG-PE (BD

Bioscience, CA, USA), anti-KLF4-APC (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) for 30 min on ice. After that time, cells were washed with 300 µL of flow buffer and spun down at 500 g ($r = 11$ cm) for 5 min at room temperature. Cells incubated for anti-CK17, after the time elapsed, were washed and incubated with FITC-coupled secondary antibody for 30 min on ice. At the end of the incubation, cells were washed again with flow buffer, spun down, and supernatant was removed. All cells were then washed and fixed with 4% p-formaldehyde in PBS. Every marker was also incubated with isotype controls under the same conditions of the primary antibodies. Stained cells were read in ATTUNE NXT (Thermo Fisher Scientific Inc). At least ten thousand events were recorded for each flow cytometry measurement. FlowJo® software was utilized for analyzing data.

Western blot analysis

The total proteins from HeLa monolayers (confluence 70–80%) and cervospheres treated or untreated with 200 µM of I₂ for 24 h were extracted with RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) supplemented with a complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche, USA) and incubated on ice for 20 min. The protein concentrations were measured using the Bradford method (Bio-Rad, USA). Samples containing 70 mg of protein were boiled in SDS containing sample buffer (10% SDS, 20% glycerol, 20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10 mM β-mercapto-ethanol, and 0.05% bromophenol blue), separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat milk in PBS containing 0.1% Tween-20 for 1 h and incubated with the appropriate antibody dilution. The PPARγ antibody (sc-7196, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:1000 and GAPDH antibody (sc-48167, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:10000. The following HRP-conjugated secondary antibodies were used at a dilution of 1:10000 anti-rabbit (sc-2313, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) and the anti-goat (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) was used at a dilution of 1:20000. The proteins were visualized through an enhanced chemiluminescence reaction using the Super Signals West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA). Densitometry was performed using ImageJ software (version 1.41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and chemiluminescence was normalized to the level of GAPDH protein.

Total RNA extraction, quantification of mRNA by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RNA extraction of HeLa monolayers (confluence 70–80%) and cervospheres treated or untreated with 200 μ M of I₂ for 24 h was carried out using Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15596026), the extracted RNA was treated with DNaseI (ThermoFisher, Cat. No. EN0521) and purified using the Direct-zol™ kit, RNA MicroPrep (Zymo Research, Cat. No. R2060). The purified RNA was quantified using an Epoch™ spectrophotometry system and subjected to retrotranscription with 2000 ng of RNA with the SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. No. 18091050) to obtain cDNA. By means of real-time PCR, the cDNA was evaluated to determine the expression levels of the PPAR γ (F-PPAR γ : TCT CTC CGT AAT GGA AGA CC and R-PPAR γ : GCA TTA TGA GAC ATC CCC AC), PTEN (F-PTEN: GAT GAG GCA TTA TCC TGT ACA CA and R-PTEN: CTC TTC AGA TAC TCT TGT GCT GT) E6 (F-E6: GCG ACC CTA CAA GCT ACC TG and R-E6: GTT GGA GTC GTT CCT GTC GT) and E7 (F-E7: TGA AAT TCC GGT TGA CCT TC and R-E7: CAC GGA CAC ACA AAG GAC AG) genes. The oligonucleotides for the GAPDH gene (F-GAPDH: AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT G and R-GAPDH: CCA TGG GTG GAA TCA TAT TGG AA) were used as control. Placing 100 ng of cDNA, 12.5 μ L of the master mix Maxima SYBR and 10 pmol of each oligonucleotide in a total volume of 25 μ L carries out real-time PCR. The reaction conditions are 95 °C for 10 min for initial denaturation, 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s for denaturation, alignment and extension, respectively. The reaction was performed on the QIA-GEN Rotor-Gene Q equipment. The expression levels of the mRNAs were determined from the threshold cycle (Ct), and the relative expression levels were calculated using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method. For mRNA quantification, the Ct values were normalized to the expression of the GAPDH mRNA level.

Viability assay

The effects in viability of HeLa and SiHa monolayers treated or untreated with 100, 200 and 400 μ M of I₂ for 24 h and HeLa cervospheres treated or untreated with 200 μ M of I₂ for 24 h, were analyzed using the OZBlue Cell Viability Kit (OZ Biosciences, San Diego, USA) following the supplier's instructions.

Animals and in vivo tumorigenic assays

This study was approved by Research and Bioethics of Instituto Nacional de Cancerología's Committee [Prot. No. 018/012/IBI] (CEI/1096/17), Dated 03.02.2018]. NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency) female mice were used in this work to test the tumorigenic capacity of CCSC-like I₂-treated and untreated. The animals

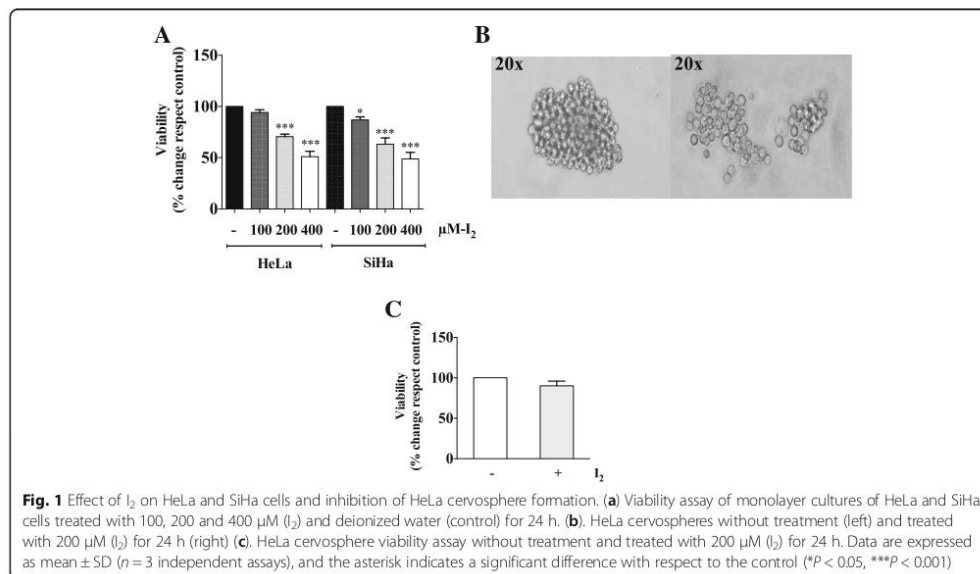
were 4–6 weeks old, weighed 21–25 g and were obtained from the Unidad de Modelos Biológicos of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. After acclimation in the bioterium of Instituto Nacional de Cancerología, they were randomly designated to experimental groups. Mice were xenotransplanted subcutaneously (s.c) with HeLa monolayer cells and their respective cervosphere cells treated or untreated with 200 μ M of I₂ for 24 h at different amounts using six mice per group. Through-out experiment, mice lived in a room with 12-h/12-h light/dark cycle, at a temperature of 27 °C, 60% of relative humidity and had free access to chow and water. Mice were monitored for at least 2 months. The handling and execution of experimental procedures in mice were carried out according with local and international guidelines such as the official Mexican standard NOM-062-ZOO-1999 (Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals), the code of ethics of IIB–UNAM and other international guidelines. For subcutaneous tumors in mice, the maximal allowable size is 2 cm in diameter (Tumor Policy for Mice and Rats from Boston University Research Compliance). Tumor growth was monitored three times a week for up to 8 weeks. At the end of the 8 weeks, a humanitarian final point was made; the mice were euthanized in a compressed CO₂ chamber. After that, tumors were extracted through a cut made in the skin and they were measured, weighed and photo-documented. Each tumor was measured by a vernier caliper and the tumor volume was calculated using the Attia-Weiss formula "Tumor volume = (0.4) (a) (b ^ 2)", where "a" is the largest diameter and "b" the smallest diameter of each tumor.

Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism software (v 6.0; GraphPad Software, Inc., CA, USA). One or two-way ANOVA was performed to determine the significance of differences between groups. Data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and values with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results**Molecular iodine interferes with viability of HeLa and SiHa monolayer cell cultures and cervosphere formation of HeLa**

A dose-response curve (100 μ M, 200 μ M, 400 μ M) of I₂ for 24 h was carried out to evaluate cell viability under adherent (monolayer) culture conditions of HeLa and SiHa cells (Fig. 1a). HeLa cells were slightly more resistant than SiHa at 100 μ M I₂ and the antiproliferative effect of I₂ exhibited a sustained dose-response in both cells types. To evaluate a possible effect of I₂ in CCSC-like cells, since 400 μ M I₂ showed high cytotoxicity, we selected 200 μ M I₂ for further experiments. A supplement



of 200μM I₂ (24 h) interfered with HeLa cervosphere formation, since the I₂-treated cervospheres were observed to be smaller, with irregular conformation compared to the untreated cervospheres (Fig. 1b), however, cell viability wasn't affected (Fig. 1c).

CD49f expression in HeLa cervospheres and SiHa monolayer and cervosphere cultures is inhibited by molecular iodine

CD49f protein was evaluated under non-adherent conditions (cervospheres) for 7 days (data not shown). On the third day, we found the highest protein level of CD49f suggesting a significant proportion of cancer stem cell-like cells. Monolayer and cervospheres were treated on the second day with 200 μM I₂ or deionized water (control) for 24 h. I₂ was effective in reducing the expression of CD49f in HeLa and SiHa cervospheres and their respective monolayers, even the expression of CD49f in HeLa monolayer is very low, treatments with molecular iodine decreased its expression, although not to significant levels under these treatment conditions (Fig. 2).

Molecular iodine significantly reduces CK17 in both HeLa and SiHa monolayer and cervosphere cultures

CK17 is a marker for cervical stem cell identification [16, 21] and is an essential marker for the identification of CCSC. As with the CD49f molecular iodine assay, HeLa and SiHa cervospheres and monolayer cells were treated on the second day with 200 μM of I₂ or deionized water

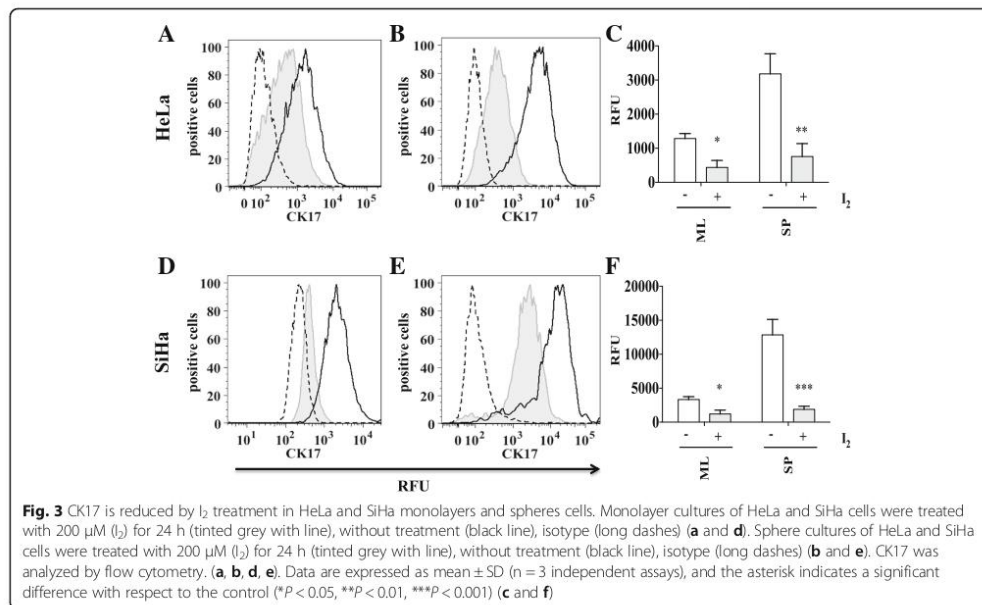
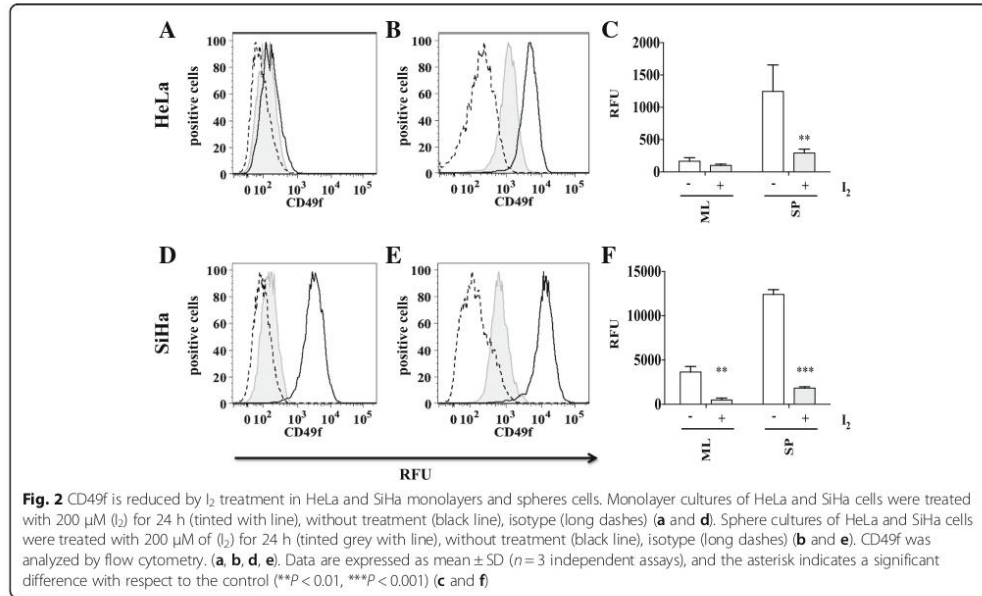
(control) for 24 h. Cytometry analysis showed that I₂ was capable of decreasing CK17 protein levels in both HeLa and SiHa cells under monolayer and cervosphere conditions (Fig. 3).

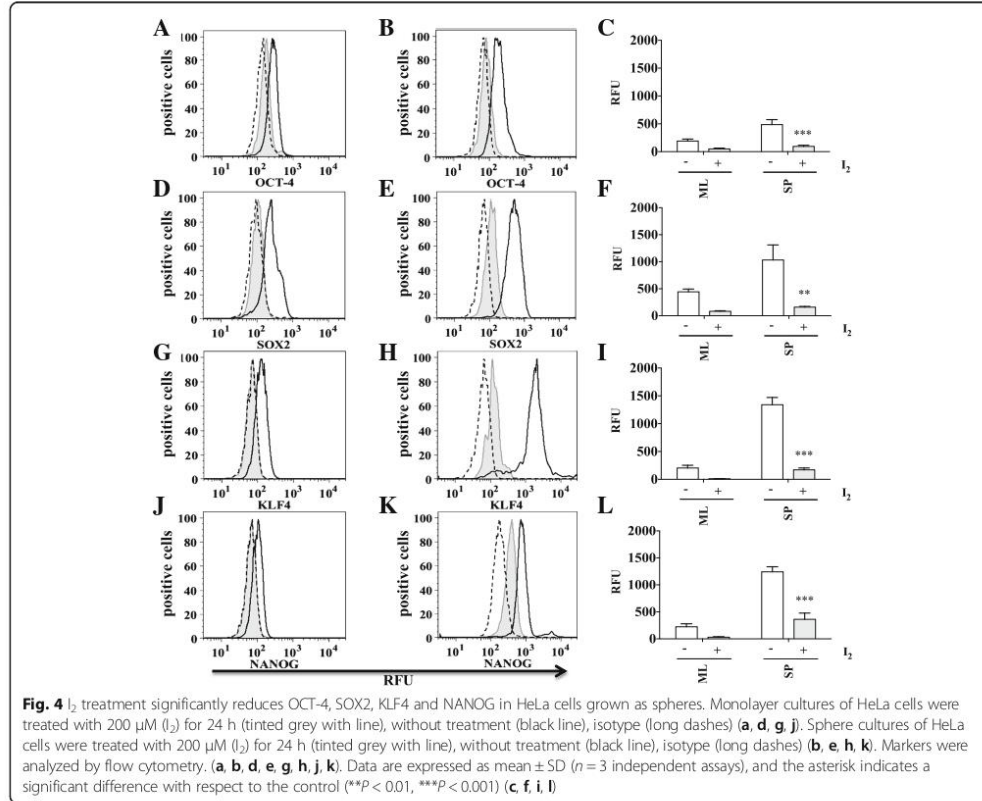
OCT-4, SOX2, KLF4 and NANOG stemness markers are significantly reduced by molecular iodine treatment only in HeLa and SiHa cervospheres

Identifying stemness markers such as OCT-4, SOX2, KLF4, and NANOG is needed to evaluate stemness of our cervospheres. We evaluated these transcription factors in HeLa and SiHa cells grown as monolayers and cervospheres in the presence or absence of I₂ treatment. As expected, we found more stemness marker proteins in cervospheres compared to monolayer cells. Interestingly, OCT-4, SOX2, KLF4, and NANOG markers were down regulated by I₂ treatments in both cervosphere and monolayer cultures of HeLa (Fig. 4) and SiHa (Fig. 5) cells.

Activation of PPAR gamma is up-regulated by molecular iodine treatments in HeLa cells

It has been proposed that the antineoplastic effect of the molecular iodine is mediated by activation of PPARγ receptors by 6-iodolactone, in turn causing an increase in these receptors after treatment [33, 34]. Monolayer and cervospheres of HeLa cells were incubated with 200 μM of I₂ for 24 h, resulting in a significant increase in PPAR gamma proteins compared to their untreated counterparts (Fig. 6a, b). To corroborate the activation of PPARγ we





analyzed the expression of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), a known PPARγ-regulated gene (reviewed in [36]). Figure 6c shows that I₂-supplemented HeLa cells exhibit significant increase of PTEN gene expression in both monolayers and cervospheres. This result indicates that the mechanism of the antineoplastic effects of molecular iodine could be through PPAR gamma. Figure 6d, e shows the effect of I₂ on HPV18 E6 and E7 gene expression, resulting in a significant reduction of E6 and E7 expression in monolayers cells and no effect in cervospheres treated with I₂.

Molecular iodine treatments decrease the capacity for tumor formation of HeLa cervospheres

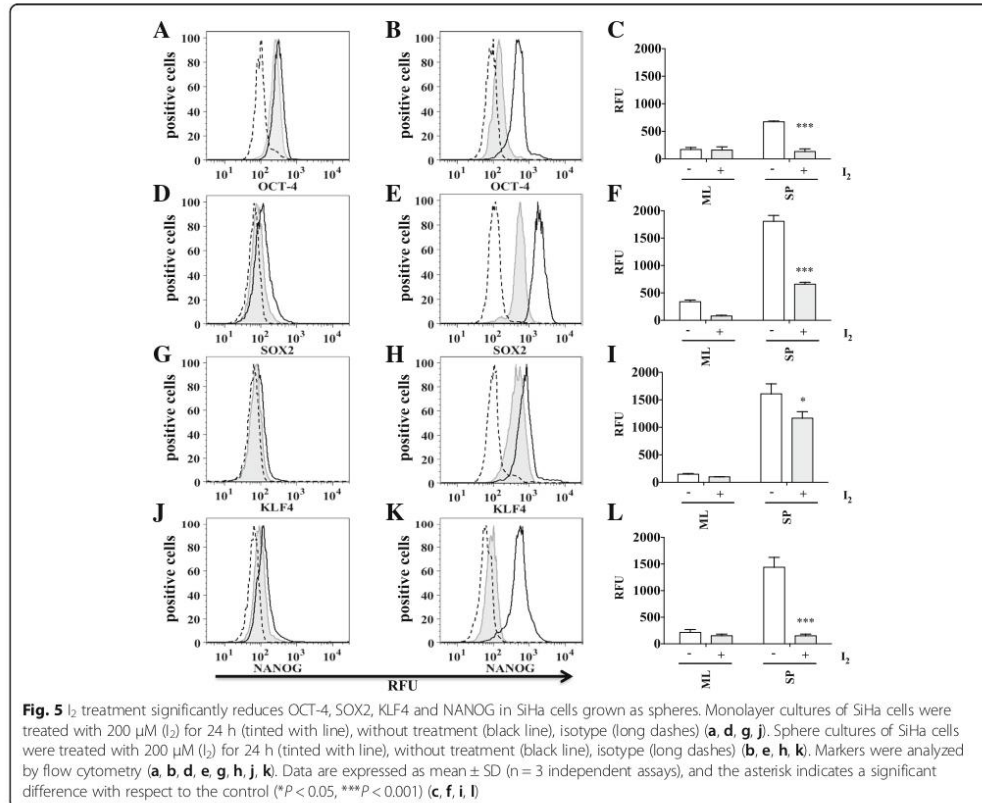
It has been demonstrated that cervospheres have higher tumorigenic capacity compared to their monolayer counterparts (15,16). In this paper, we evaluated the effect of I₂ treatments on cervosphere tumorigenic capacity using an in vivo assay. Mice were inoculated with HeLa cervospheres

pre-incubated for 24 h with 200 μM I₂ or deionized water. Each animal was inoculated with both populations on the left or right side, respectively (Fig. 7a).

Figure 7b, c show that I₂-treated cervospheres promoted smaller tumors in 6/6 mice, suggesting an anti-tumorigenic effect of I₂ on these cervical cancer highly tumorigenic cells, as characterized by CD49f, CK17 and stemness markers. Tumors began to grow from 17 days after inoculation in the mice and tumor growth was evaluated for 49 days. We observed that untreated cervospheres formed bigger tumors with a maximum average size of 594.9 mm³ whereas the cervospheres treated with I₂ formed tumors of much smaller size, with a maximum average size of 150.8 mm³ (Fig. 7d). No adverse events were found in the experimental groups.

Discussion

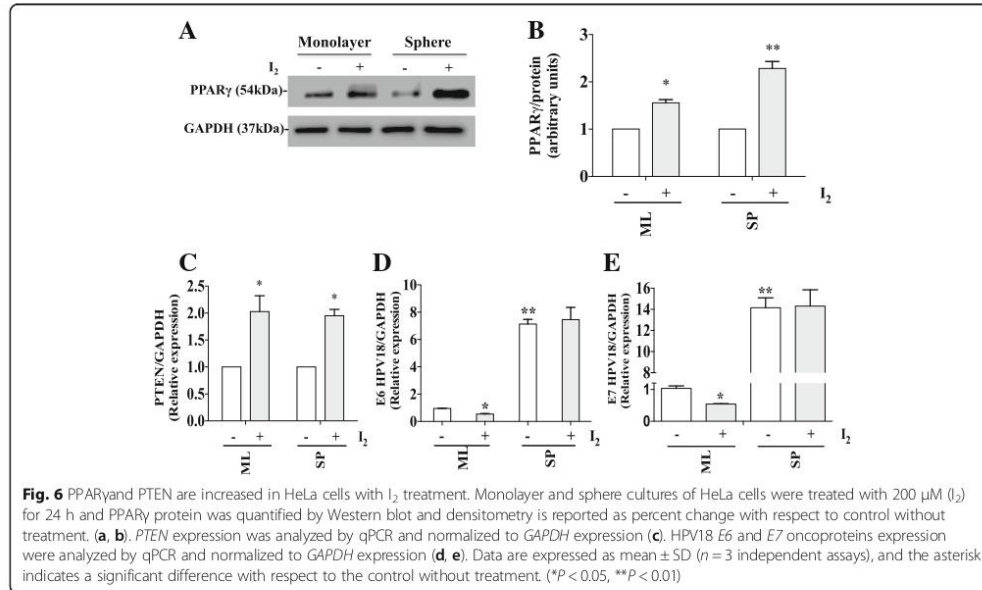
The percentage of cancer stem cells is very low in tumors, which makes it difficult to study them. Spheroidal



cultures have been shown to enrich CSC-like cells and are a good system to evaluate CSC-related characteristics of solid tumors in vitro [37], but according to Blagosklonny (reviewed in [38]), these cells should be called stemloids since they possess high proliferation capacity, self-renewal and could be responsible for the reappearance of cancer after therapy. Many studies evaluate the biology of CSC and the mechanisms that give them chemo-resistance capacity. CSC shows resistance to many chemotherapeutics such as cisplatin, 5-FU, and doxorubicin. This is achieved through their high expression of pro-survival proteins, efficient ABC transporters to pump out drugs, signaling pathways that give them resistance properties, and much higher activated phosphorylation of DNA damage response factors [39–42]. Several strategies have been used to inhibit all these properties but they have not been enough, so the chemo-resistance of CSC requires new approaches aimed at eliminating these highly tumorigenic cells.

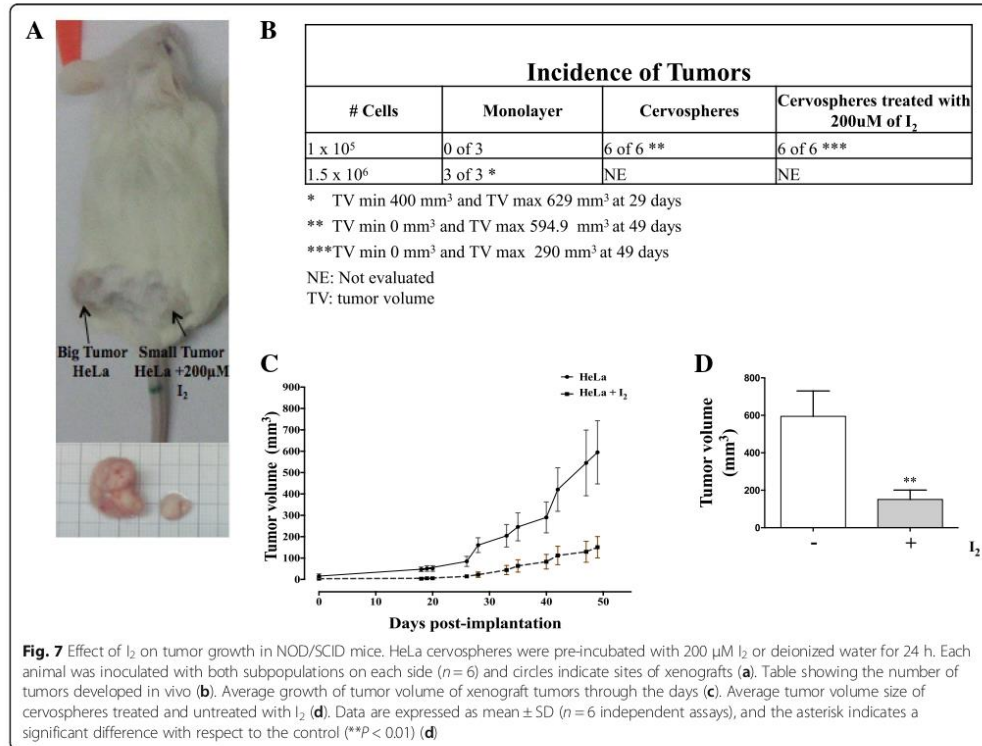
Molecular iodine has been studied in several cancer cell lines showing its ability to inhibit proliferation,

chemo-resistance, and apoptotic effects [30–35], however there are no reports on its effect on cervical cancer cell lines nor on cultures enriched with cancer stem-like cells. HeLa and SiHa are the most representative cervical cancer cell lines and in this study, we used cultures grown under non adherent conditions (cervospheres) where we obtained a higher proportion of CSC-like cells compared to traditional monolayer cultures, allowing us to study the effect of I₂ on CSC derived from cervical cancer cell lines. We showed that I₂ treatment decreased cervosphere formation, additionally, we observed living cells and some dead cells in these spheres; however, we do not know whether I₂ treatment induces death in CCSC-like cells. Our group, as well as other authors, has proposed CD49f and CK17 as putative markers to isolate cervical cancer stem cells [15, 16]. CD49f is considered to be a stem cell marker for normal and cancer cells and is the only marker that is shared by more than 30 stem cell populations, being one of its main characteristics the maintenance of self-renewal (reviewed in [43]). It's also a crucial



molecule for the growth and survival of the breast stem cell-like subpopulation that displays increased proliferation and greater resistance to pro-apoptotic agents [44]. The importance of CD49f in cervical cancer is enhanced by its ability to act as a co-receptor for the entry of HPV into the host cells [45, 46]. CK17 is a marker of the HPV target cell, the cervical reserve (stem) cell which gives rise to metaplasia, and loss of CK17 induces cellular differentiation and attenuates tumorigenesis in cervical epithelia [21, 22, 47, 48]. We observed that cells treated with I₂ show a decrease in CD49f and CK17 protein expression, molecules considered to be CCSC phenotype markers (reviewed in [43, 49]). Since CD49f is important for maintaining stem cell self-renewal, we hypothesize that the decrease in CD49f+ cells caused by I₂ could have an important effect on the CCSC-like biology, including tumorigenic capability. To validate the tumorigenic capability of a human cancer cell line, xenotransplantation must be performed in immunodeficient mice, a model used to promote tumor growth derived from human cancer for the analysis of malignant tumors and the evaluation of antitumor drugs [50]. Since I₂ exhibited similar effects on HeLa and SiHa cell lines, we decided to use only HeLa cells for in vivo experiments to evaluate its effect over CCSC. Mice assays, using I₂-treated cells, we observed that I₂ treatment delays tumor growth, and make them unable to keep the tumor growing, suggesting that I₂-treated CCSC-like cells have a lower capacity for tumor formation compared

to non-treated CCSC-like cells. However, since the cells are still alive after I₂ treatment, it's clear that I₂ treatment can help reduce their tumorigenic capability as observed through the reduction of tumor size and delayed tumor growth. Evaluation of HeLa monolayer cells treated with I₂ were not pursued, since we focused our interests in evaluating the effect of I₂ in cancer stem-like cells. Additionally, the effect of I₂ on CCSC-like cells was observed by evaluating stemness markers, such as NANOG, SOX2, KLF4 and OCT-4, in cervospheres. It has been demonstrated that there is an increase in expression of these stemness markers in cervical carcinomas, compared with normal cervical tissue, and that their overexpression in cell lines derived from cervical cancer confers them an increased capacity for proliferation, clonogenicity, and tumorigenicity in vitro and in vivo, as well as promoting stem cell characteristics [51–54]. Interestingly, we observed different stemness marker levels between HeLa and SiHa cervospheres, mainly in KLF4 and SOX2 protein levels. This indicates that the mechanisms for self-renewal could be cell type-dependent. Our cervospheres showed overexpression of these stemness markers compared with their monolayer counterparts, as reported [15, 16]. Furthermore, I₂ had the ability to decrease their expression in cervospheres, supporting a role for I₂ in decreasing the tumorigenic capacity of these cancer cells, because as reported in the literature, the decrease of these stem cell markers makes the cancer cells less tumorigenic



[27–29, 54]. The mechanism proposed by which I₂ decreases cell proliferation is through the interaction and activation of the PPAR gamma receptor [34, 55]. In this work we show that in CCSC-like cells derived from I₂-treated cervical cancer cell lines, PPAR gamma protein level was increased compared to untreated CCSC-like cells. As consequence, PPAR gamma activation promotes greater expression of its target gene, PTEN [56], in our CCSC-like cultures compared to their monolayer counterparts. These observations suggest that the mechanism whereby I₂ decreases CD49f, CK17 and stemness markers in CCSC-like cells could be mediated by the activation of PPAR gamma receptors and consequently the activation of its PTEN response gene involved in self-renewal mechanisms. In addition to decreasing self-renewal capacity, PTEN activation reduces cell proliferation and tumorigenicity in CSC (reviewed in [57]). However, additional assays are needed to further address the mechanism by which I₂ is able to decrease the tumor volume derived from CCSC-like cells.

Tyagi and collaborators demonstrated that the increase of E6 and E7 gene expression is close related with

the stemness mediated by HES1, a specific transcription factor of NOTCH signal pathway [58]. In our conditions, we also observed an increase of E6/E7 expression in spheres cultures. Interesting, I₂ treatment decrease the E6/E7 expression in HeLa monolayer cell culture conditions, an effect that was no observed in sphere culture conditions, suggesting that I₂ doesn't have any effect on E6/E7 HPV18 gene expression in CCSC-like.

Conclusions

In resume, our results demonstrate the I₂-mediated cytotoxic effect in CSC derived from cervical cancer cell lines, in which CD49f, CK17 and stemness marker positive cells are decreased. Since I₂ supplements are considered to be safe for the treatment of diseases such as human mammary fibrocystic disease, breast cancer or prostate hyperplasia (reviewed in [30]), we suggest that I₂ treatment for cancer should be studied in preclinical trials to evaluate its potential anti-cancer effect alone or in a combination with conventional therapeutic drugs, to eliminate cancer stem cells from cervical cancer and others.

Abbreviations

6-I: 6-iodolactone; CCSC: Cervical cancer stem cells; CSC: Cancer stem cells; ES: Embryonic stem; HPV: Human papillomaviruses; I₂: Molecular Iodine; PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor type gamma; PTEN: Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

Acknowledgments

We thank the LABNALCIT-UNAM (CONACYT) for the technical support in the acquisition of flow cytometry samples, Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México for grant support to GDB-O, Miriam Guido for technical assistance, Iván Velasco, Ph.D, for critical and academic support, Cody Howe, Joseph Bires for proofreading and Elizabeth Langley McCarron, Ph.D, for proofreading and critical discussion. This manuscript is part of the doctoral dissertation project of Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez, a student of the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México grant 0253804 to AG-C) and Instituto Nacional de Cancerología (INCan to AG-C, Secretaría de Salud (México). The funding bodies had no role in the design of the study, collection, analysis, interpretation of data and, in writing the manuscript. Funding was for purchase of chemicals and kits required for conducting the study. CONACYT-México grant (4141259) and SENESCYT (Ecuador), were fellowships to support the doctoral studies of Gabriele Davide Bigoni-Ordóñez.

Availability of data and materials

The data analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

GDB-O performed all the experiments, participated in scientific discussions and wrote the manuscript; EO-S performed flow cytometry assays and participated in scientific discussions; PR-C performed RT-qPCR assays; HAV-G performed in vivo tumorigenic assays; CA and AG-C provided the concept design and scientific direction, led scientific discussions and contributed to editing and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Ethics approval

The Committee for Research Ethics and for Animal Care and Use in Research, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City (Mexico) approved the present study [Prot. No. 018/012/18] (CEI/1096/17). We handled animals in compliance with the revised Animals (Scientific Procedures) Act 1986. This article adheres to the ARRIVE guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>) for the reporting of animal experiments.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹División de Investigación Básica, Laboratory of Virus and Cancer, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud, Av. San Fernando No. 22, Sección XVI, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CP, México. ²Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, Mexico City, Mexico. ³Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, Mexico City, Mexico. ⁴Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Campus-Juriquilla, Querétaro 76230, Qro, Mexico. ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

Received: 8 March 2018 Accepted: 14 September 2018

Published online: 26 September 2018

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50.
3. Boulet G, Horvath C, Broeck VD, Sahebal S, Rogers J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):2006–11.
4. Ueno T, Sasaki K, Yoshida S, Kajitani N, Satsuka A, Nakamura H, Sakai H. Molecular mechanisms of hyperplasia induction by human papillomavirus E7. *Oncogene*. 2006;25(30):4155–64.
5. O'Brien CA, Kreso A, Dick JE. Cancer stem cells in solid tumors: an overview. *Semin Radiat Oncol*. 2009;19(2):71–7.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105–11.
7. Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, Andruis M, Schimacher P, Sinn HP. Reduction of CD44(+)/CD24(–) breast cancer cells by conventional cytotoxic chemo-therapy. *Hum Pathol*. 2010;41(4):574–81.
8. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, Medema JP. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *The Lancet Oncol*. 2012;13(2):e83–9.
9. Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, Chung IY, Kim IA, Kim EJ, Choi Y, Ryu HS, Park SY. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011;104:1730–8.
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983–8.
11. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106–10.
12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.
13. Dick JE. Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1044:1–5.
14. Hardavella G, George R, Sethi T. Lung cancer stem cells-characteristics, phenotype. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):272–9.
15. López J, Poitevin A, Mendoza-Martinez V, Pérez-Plasencia C, García-Carrancá A. Cancer-initiating cells derived from established cervical cell lines exhibit stem-cell markers and increased radioresistance. *BMC Cancer*. 2012;12:48.
16. Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñoz-Hernández S, Garrido E, Cantú De León D, García-Carrancá A. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget*. 2016;7(22):31943–54.
17. Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*. 2004;72(8):387–95.
18. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Ohta K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M. CD49f-positive cell population efficiently enriches colon cancer-initiating cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):425–30.
19. Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol*. 2013;87(11):6062–72.
20. Smedts F, Ramaekers F, Troyanovsky S, Pruszczynski M, Robben H, Lane B, Leigh I, Plantema F, Vooijs P. Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 1992;140(3):601–12.
21. Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer Res*. 2004;24(2B):771–775.
22. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep*. 2009;22(5):1129–34.
23. Rosner MH, Vignano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirie F, Rigby PWJ, Staudt LM. A pou-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 1990;345(6277):686–92.

24. Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol*. 2006;26(20):7479–91.

25. Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):15–30.

26. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*. 2005;105(2):635–7.

27. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499–507.

28. Tai SK, Yang MH, Chang SY, Chang YC, Li WY, Tsai TL, Wang YF, Chu PY, Hsieh SL. Persistent Kruppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2011;102(4):895–902.

29. Wang Y-D, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis*. 2013;4:e760.

30. Rosner H, Torremente P, Moller W, Gartner R. Antiproliferative/cytotoxic activity of molecular iodine and iodolactones in various human carcinoma cell lines. No interfering with EGF-signaling, but evidence for apoptosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;118(7):410–9.

31. Vitale M, Di Matola T, D'Ascoli F, Salzano S, Bogazzi F, Fenzi G, Martino E, Rossi G. Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress. *Endocrinology*. 2000;141(2):598–605.

32. Arroyo-Helguera O, Rojas E, Delgado G, Aceves C. Signaling pathways involved in the antiproliferative effect of molecular iodine in normal and tumoral breast cells: evidence that 6-iodolactone mediates apoptotic effects. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1003–11.

33. Nuñez-Anita RE, Arroyo-Helguera O, Cajero-Juárez M, López-Bojorquez L, Aceves C. A complex between 6-iodolactone and the peroxisome proliferator-activated receptor type gamma may mediate the antineoplastic effect of iodine in mammary cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2009;89(1–2):34–42.

34. Nava-Villalba M, Aceves C. 6-iodolactone, key mediator of antitumoral properties of iodine. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2014;112:27–33.

35. Bontempo A, Ugaldé-Villanueva B, Delgado-González E, Rodríguez AL, Aceves C. Molecular iodine impairs chemoresistance mechanisms, enhances doxorubicin retention and induces downregulation of the CD44+/CD24+ and E-cadherin+/vimentin+ subpopulations in MCF-7 cells resistant to low doses of doxorubicin. *Oncol Rep*. 2017;38(5):2867–76.

36. Teresi RE, Waite KA. PPARgamma, PTEN, and the fight against Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:932632.

37. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):283–9.

38. Blagosklonny MV. Cancer stem cell and cancer stemoids: from biology to therapy. *Cancer Biol Ther*. 2007;6:1684–90.

39. Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Takeda Y, Dono K, et al. Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2009;100:1647–58.

40. Flahaut M, Meier R, Coulon A, Nardou KA, Niggli FK, Martinet D, Beckmann JS, Joseph JM, Muhlethaler-Mottet A, Gross N. The Wnt receptor FZD1 mediates chemoresistance in neuroblastoma through activation of the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogene*. 2009;28:2245–56.

41. Gallmeier E, Hermann PC, Mueller MT, Machado JG, Ziesch A, De Toni EN, Palagyi A, Eisen C, Ellwart JW, Rivera J, et al. Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the in vitro and in vivo tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133(+) tumor-initiating cell fraction. *Stem Cells*. 2011;29:418–429.36.

42. Madjd Z, Mehrjerdi AZ, Sharifi AM, Molanaei S, Shahzadi SZ, Asadi-Lari M. CD44+ cancer cells express higher levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in breast tumours. *Cancer Immun*. 2009;9:4.

43. Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The role of integrin in stem cells: more than a conserved biomarker. *Stem Cells Dev*. 2017;26(15):1090–9.

44. Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, Purushotham AD. Alpha-6 integrin is necessary for the tumorigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2008;122(2):298–304.

45. McMillan NA, Payne E, Frazer IH, Evander M. Expression of the alpha6 integrin confers papillomavirus binding upon receptor-negative B-cells. *Virology*. 1999;261(2):271–9.

46. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, Mc Millan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 1997;71(3):2449–56.

47. Regauer S, Reich O. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology*. 2007;50(5):629–35.

48. Hobbs RP, Batazzi AS, Han MC, Coulombe PA. Loss of keratin 17 induces tissue-specific cytokine polarization and cellular differentiation in HPV16-driven cervical tumorigenesis in vivo. *Oncogene*. 2016;35(43):5653–62.

49. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytokeratin 8 and cytokeratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):598–602.

50. Engel AM, Schou M. Assay of tumorigenicity in nude mice. In: *Cell biology: a laboratory handbook*. Burlington: Eds. Elsevier Academic; 2006. p. 353–7.

51. Liu XF, Yang WT, Xu R, Liu JT, Zheng PS. Cervical cancer cells with positive Sox2 expression exhibit the properties of cancer stem cells. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87092.

52. Li SW, Wu XL, Dong CL, Xie XY, Wu JF, Zhang X. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118033.

53. Mak VC, Siu MK, Wong OG, Chan KK, Ngan HY, Cheung AN. Dysregulated stemness-related genes in gynecological malignancies. *Histol Histopathol*. 2012;27(9):1121–30.

54. Ding Y, Yu AQ, Wang XL, Guo XR, Yuan YH, Li DS. Forced expression of Nanog with mRNA synthesized in vitro to evaluate the malignancy of HeLa cells through acquiring cancer stem cell phenotypes. *Oncol Rep*. 2016;35(5): 2643–50.

55. Nava-Villalba M, Nuñez-Anita RE, Bontempo A, Aceves C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is crucial for antitumoral effects of 6-iodolactone. *Mol Cancer*. 2015;14:168.

56. Teresi RE, Shaiu CW, Chen CS, Chatterjee VK, Waite KA, Eng C. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by lovastatin and rosiglitazone. *Int J Cancer*. 2006;118(10):2390–8.

57. Guffreda L, Falcone I, Incani UC, Del Curatolo A, Concianti F, Matteoni S, Vari S, Vaccaro V, Cognetti F, Milella M. PTEN expression and function in adult cancer stem cells and prospects for therapeutic targeting. *Adv Biol Regul*. 2014;56:66–80.

58. Tyagi A, Vishnoi K, Mahata S, Verma G, Srivastava Y, Masaldan S, Roy BG, Bharti AC, Das BC. Cervical Cancer stem cells selectively overexpress HPV Oncoprotein E6 that controls Stemness and self-renewal through upregulation of HES1. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4170–84.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

