

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

***METILACIÓN DE LA REGIÓN LARGA DE
CONTROL (LCR) Y L1 DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO TIPO 18 (HPV 18), EN
LINEAS CELULARES***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

ROCIO SUSANA MÉNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCÁ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

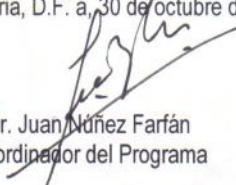
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de agosto del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Méndez Martínez Rocío Susana** con número de cuenta **83092037** con la tesis titulada: "**Metilación de la región larga de control (LCR) y L1 del virus del papiloma humano tipo 18 (HPV 18), en líneas celulares**" bajo la dirección del **Dr. Alejandro García Carrancá**.

Presidente:	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Vocal:	Dr. Mauricio Salcedo Vargas
Secretario:	Dr. Alejandro M. García Carrancá
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de octubre del 2006


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizo en la División de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección del Dr. Alejandro García Carrancá.

Este trabajo se lo dedico a:

A Dios y a la vida por permitirme concluir esta etapa, seguir adelante y estar al lado de la gente a la que amo.

A ti Hija por ser el gran amor de mi vida, por estar a mi lado y ser por siempre el motor que me impulsa a seguirme superando.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional Los Amo con todo mi Ser.

A mi Hermana Rosario quien siempre ha estado a mi lado en las buenas y en las malas. Mil gracias por todo lo que me has dado.

A mis hermanos Salvador, Martín, Luís, Alberto y Alex por su cariño y estar siempre a mi lado cuando mas lo he necesitado.

A mis cuñadas por su apoyo, comprensión y cariño.

A mis niños: Marco Antonio, Maria Fernanda,
Emmanuel y Adriana. Quienes llenan mi vida
de ilusión y de amor.

AGRADECIMIENTOS:

Al Doctor Alejandro García Carranca por creer en mi, gracias por su apoyo.

A la Bióloga Miriam C. Guido Jiménez por su apoyo, amistad y compañerismo.

A Lupita y Raquel por su comprensión y apoyo.

A la M. en C. Silvia C. Galván Huerta por apoyarme en el análisis de los resultados y por su amistad.

A Gabriela, Cristian y Salvador por su amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio.

A todas aquellas personas que han estado con migo a lo largo de este trabajo y de mi vida.

INDICE

INTRODUCCION	1
Características de los HPV	1
Organización Genómica	3
Ciclo de Vida.	9
Integración del ADN.	12
Regulación de la Transcripción.	13
Epigenética	14
Acetilación, Desacetilación y Metilación de Histonas.	14
Metilación y Desmetilación del ADN.	16
Epigenetica y HPV.	19
JUSTIFICACION	23
HIPOTESIS	25
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos específicos	27
METODOLOGIA	29
Líneas Celulares	29
Extracción de ADN.	29
Amplificación de LCRs	30
Modificación de ADN con Bisulfito de Sodio	30
PCR de ADN modificado con Bisulfito de Sodio	31
Clonación de los productos de PCR del ADN modificado	32
Transformación bacteriana.	32
PCR de las colonias bacterianas	33
Análisis de secuencias nucleotídicas de los fragmentos geonómicos clonados	34
Limpieza de los productos de PCR por el método EXO-SAP	34
Reacción de PCR para Secuenciación	34

Limpieza de productos amplificados en la reacción de Secuenciación	34
Secuenciación de productos amplificados	34
RESULTADOS	35
DISCUSION Y CONCLUSION	45
BIBLIOGRAFIA.	48

INTRODUCCION

El cáncer cervical es la segunda causa más común de cáncer en la mujer a nivel mundial, pero es la primera en países en vías de desarrollo, en México ocupa el primer lugar de incidencia y es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres en edad reproductiva. Su incidencia esta relacionada con la infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV) de alto riesgo, los genomas virales se encuentran presentes en el 99.7% de los carcinomas cervicales (Zur Hausen 1999). Los tipos más prevalentes dentro de este grupo son el HPV 16 con alrededor de 50% y el HPV 18, con aproximadamente 20% de prevalencia en los cánceres cervicales (García-Carranca *et al*, 1993).

Los tipos de HPV transmitidos sexualmente pueden persistir por muchos años sin causar ningún daño a las células, solo una pequeña fracción de éstas progresan a lesiones neoplásicas, lo cual indica que deben existir otros factores implicados en la determinación de la progresión a transformación maligna. La sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 así como la integración del ADN del HPV, causan desestabilización en los mecanismos de reparación del ADN de la célula huésped, incrementando la replicación celular y la presencia de mutaciones (Chan, *et al.*, 1989).

La conformación de la cromatina juega un papel importante en la regulación de la expresión de los genes (Arenas-Huertero *et al.*, 2002). La metilación del ADN tiene influencia sobre la conformación de la cromatina; los cambios en el estado de metilación son las modificaciones moleculares más comunes en las neoplasias humanas. La metilación en el carbono 5 de la citosina en los dinucleótidos CpG influye tanto en la replicación como en la transcripción del ADN e interfiere en la unión de factores de transcripción que intervienen en la activación o silenciamiento de genes (Rodríguez-Dorantes *et al.*, 2004).

Características de los HPV

Los papilomavirus son virus pequeños de aproximadamente 55 nm de diámetro contienen un ADN de doble cadena de aproximadamente 8000pb (Figura 1),

pertencen a la familia Papillomaviridae tienen una cápside icosaédrica formada por 72 capsómeros en la cual se encuentra el genoma viral. Los capsómeros están compuestos por dos proteínas estructurales una de 57 KD (L1) la cual forma 80% de la cápside; y otra entre 43-53 KD (L2) (Baker *et al.*, 1987).

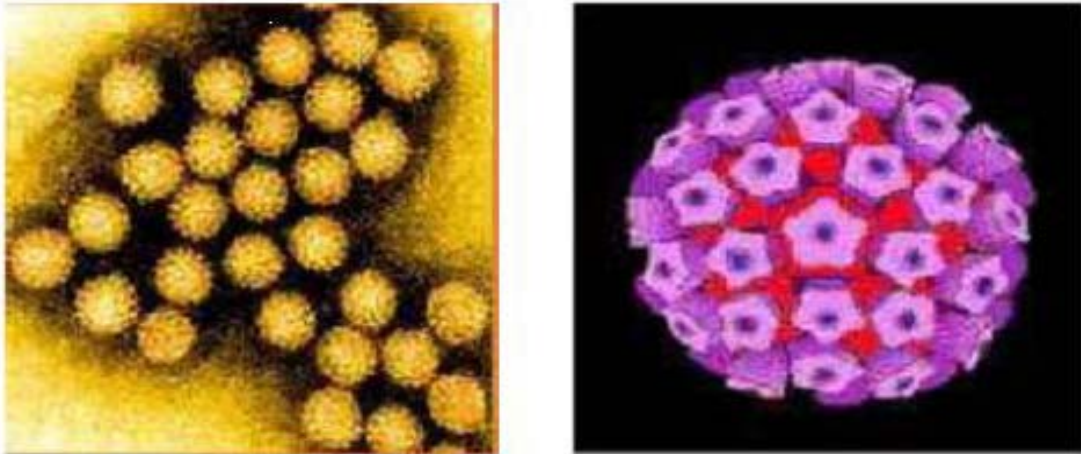


Figura 1. Virus del Papiloma Humano. Microscopía electrónica de viriones y cápside icosaédrica de un HPV.

Los papilomavirus (HPV) son específicos de especie, infectan los epitelios de la piel o de las mucosas, produciendo alteraciones en el crecimiento de la célula huésped. El ADN del HPV puede integrarse en el genoma de la célula huésped y en ese caso puede estar involucrado en la transformación oncogénica (Cullen *et al.*, 1991). La gran diversidad de los HPV y la afinidad de algunos por las mucosas genitales se hicieron evidentes desde los años 70, con los estudios de hibridación de ADN realizados en biopsias de lesiones genitales y de cáncer cervical (De Villiers *et al.*, 2004).

En los seres humanos se han identificado 200 tipos de virus del papiloma humano (De Villiers *et al.*, 2004). Más de 35 tipos distintos infectan el tracto genital y de ellos unos 20 tipos están asociados con cáncer cervical, por lo cual se consideran de alto riesgo (Munger *et al.*, 2004). Recientemente se ha realizado un estudio epidemiológico para evaluar el riesgo asociado con los tipos de HPV, los resultados señalan 15 tipos clasificados como de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82); 3 tipos clasificados como probable alto riesgo (26, 53 y 66); y 12 tipos de bajo

riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) (Munger *et al.*, 2004). El HPV 16 y el 18 son los tipos mas relacionados con la presencia de carcinoma cervical, encontrándose en 50% y 20% de los casos de carcinomas de células escamosas respectivamente. Se ha comprobado que los HPV de alto riesgo se encuentran integrados al genoma celular más frecuentemente que aquéllos no oncogénicos (Cullen *et al.*, 1991)

Organización Genómica

El genoma de los HPVs codifican para 8 proteínas, 6 de expresión temprana (E) y 2 de expresión tardía (L), cuentan con una región no codificadora (LCR). Los genes estructurales se transcriben en un solo sentido (García-Carranca, 1989), y con un arreglo para 8-10 marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para ocho proteínas importantes en el ciclo de vida viral, así como en los procesos de transformación celular (Figura 2).

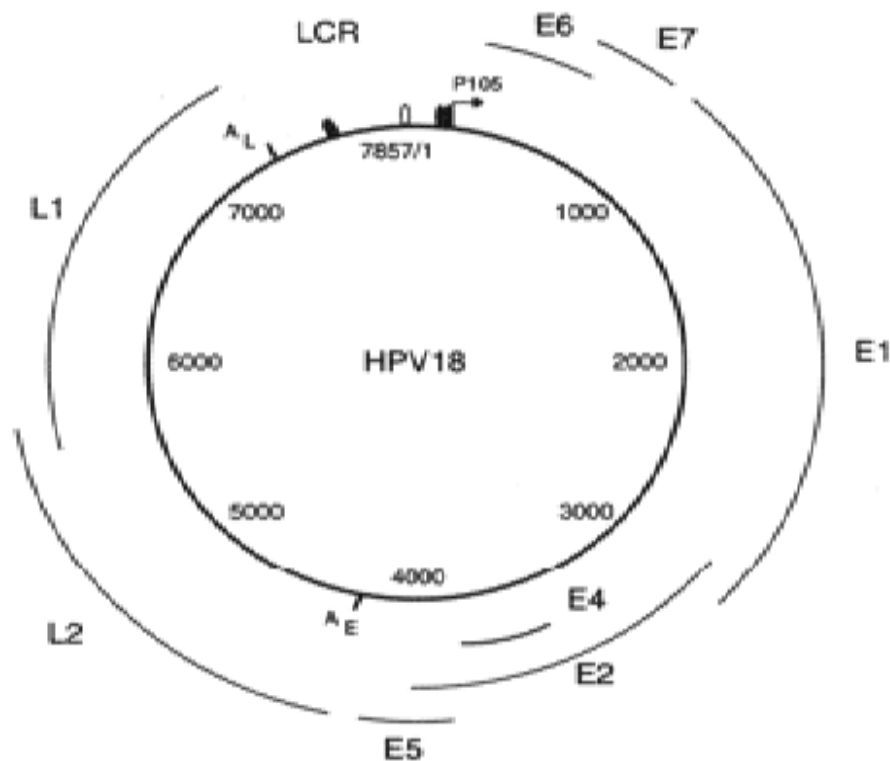


Figura 2. Organización genómica del Virus del Papiloma Humano Tipo18 (HPV 18). Posición de los genes tempranos (E), tardíos (L) y la región larga de control (LCR). En el caso del HPV 18 se ha observado que la integración del ADN del virus esta involucrada en la transformación oncogénica (De Villiers *et al.*, 2004).

La región temprana E es de aproximadamente 4 Kb, contiene 6 marcos de lectura abierta (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), los genes E5, E6 y E7 están involucrados con las propiedades transformadoras y oncogénicas del virus (Munger *et al.*, 2004). Cuando E6 y E7 interactúan destruyen las actividades antioncogénicas de P53 y Rb. Al ser degradado P53, se reduce la transcripción de p21, cuyo producto es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales activan genes que promueven la transcripción de otros para iniciar la fase S del ciclo celular. El producto del gen Rb1 es una fosfoproteína nuclear pRb que controla negativamente el ciclo celular al inactivar factores de transcripción como E2F, pero al inactivarse Rb, estos factores promueven el crecimiento celular.

Los productos proteicos codificados por E1 y E2 son de gran importancia para la replicación y transcripción del virus ya que codifican proteínas no estructurales cuya función es controlar la replicación del ADN viral, la expresión génica del virus, así como su capacidad oncogénica (Munger *et al.*, 2004). Son necesarias para la replicación extracromosomal del ADN y completar el ciclo de vida viral (Ward *et al.*, 1989).

El marcador asociado a los HPV que producen cambios neoplásicos es la pérdida de la expresión de la proteína viral E2, la cual funciona como un regulador negativo de la expresión de los oncogenes E6 y E7 de los HPV de alto riesgo (Bream *et al.*, 1993). E4 es expresada en estados de infección tardía, donde se completan y ensamblan los viriones, por lo que tiene un papel muy importante en el mantenimiento y replicación del virus (Brown *et al.*, 1994). El marco de lectura de E5 frecuentemente es eliminado en células de cáncer cervical, lo cual indica que este, no es esencial para el mantenimiento, ni la transformación de las células hospederas. Sin embargo, se ha reportado que E5 cuenta con un débil poder transformante (Crucius *et al.*, 1997). E6 y E7 son las proteínas oncogénicas más importantes en el estudio del cáncer, interaccionan e inactivan a las proteínas supresoras de tumor p53 y Rb, respectivamente (Heck *et al.*, 1992; Mugüer, 1989).

La región tardía L es de aproximadamente 3 Kb y codifica para dos proteínas de la cápside denominadas L1 y L2, se ensamblan para formar los capsómeros son consideradas genes tardíos ya que se expresan en las fases finales de la infección y

codifican para proteínas estructurales relacionadas con el ensamblaje de las partículas virales.

La tercer región es la Región Larga de Control (LCR) o no codificante tiene un tamaño de 850 pb y contiene sitios de unión para factores de transcripción, tanto virales como del hospedero, que regulan la replicación viral y la transcripción de los genes tempranos E6 y E7 (García-Carrancá *et al.*, 1988).

Funcionalmente la LCR se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, el cual es un promotor regulado por la presencia de la proteína E2 y donde se localiza tanto el origen de replicación de ADN viral, como el promotor temprano; y el dominio CE (cellular enhancer), el cual es un fuerte potenciador de la transcripción (Gius, 1998). En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes (E6 y E7) (Shwarz *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1987).

La LCR contiene los sitios de unión donde los factores de la transcripción estimulan la replicación del ADN viral. La LCR del HPV 18 contiene los sitios de unión para E2, AP1 YY1, TF1, OCT1, NF1, SP1, y la caja de TATA. E2 es un importante factor de la transcripción en las regiones del enhancer y del promotor de la LCR (García-Carrancá *et al.*, 1988). (Figura 3).

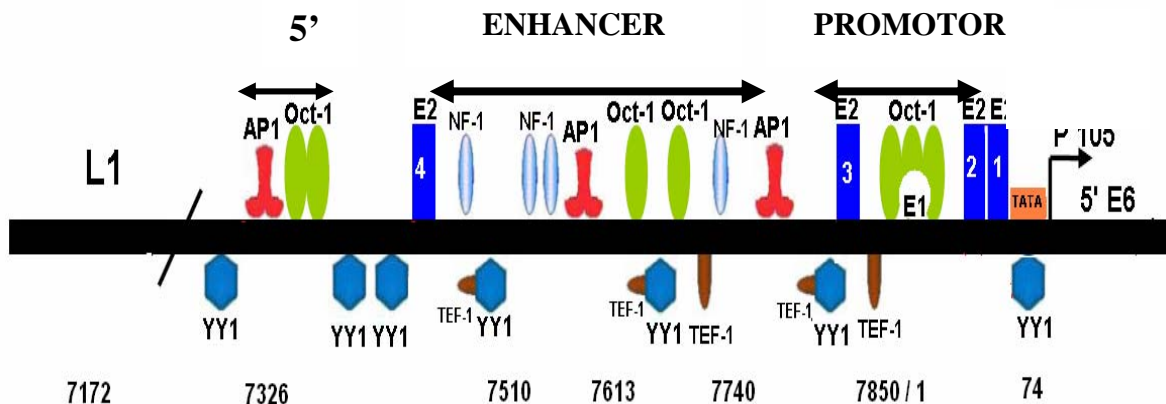


Figura 3. Región Larga de Control (LCR) del HPV 18. Factores de transcripción que se unen en la región 5', región del Enhancer y en el Promotor de la LCR del HPV tipo 18.

NF1

El NF1 (Nuclear Factor 1) regula muchos genes de señalización celular. Reconoce la secuencia consenso TTGGC(N)₆ CCAA en donde se une como un dímero al ADN e interactúa con los componentes de PIC (TFIIB, TBP y TAFII559 y coactivadores como CBP/p300 y SCR-1, donde afecta la conformación de la cromatina, desplazando a las histonas H1, las cuales se unen con poca afinidad a NF-1. Por otro lado puede tener la función de represor transcripcional por competencia directa con SP1, HFN4 y HFN1 los cuales son activadores. Dentro de la LCR del HPV 18 se encuentran 4 sitios NF1, en el caso del HPV 16 se encuentran 7 sitios de unión para NF1 que intervienen en la especificidad por el tejido. NF1 y Oct se pueden unir al ADN de manera concomitante en donde Oct ancla a NF1 a la LCR (Apt *et al*, 1993).

AP1

AP1 es una proteína dimérica, formada por homodímeros entre miembros de la familia Jun o heterodímeros entre las familias JUN y FOS. Comparte una región básica de unión al ADN la cual se encuentra adyacente a un dominio de dimerización de tipo cierre de leucinas. Se une al ADN reconociendo la secuencia consenso TGANTCA. Los sitios de unión para AP1 se encuentran en la región del enhancer en los HPVs el dominio activador de AP1 interactúa con coactivadores tales como CBP, SCR-1. Los factores AP1 regulan de manera muy fina la transcripción de genes sobre todo aquellos del ciclo celular (Thierry *et al*, 1992).

Oct-1

Es un factor que regula un gran número de genes celulares y víricos, pertenece a la familia POU la cual está formada por proteínas que comparten el sitio de unión al ADN, por poseer un sitio de unión homólogo el cual reconoce a la secuencia consenso ATGCAAAT. Oct-1 se une a un octámero, en el enhancer del HPV18 se encuentran dos sitios de unión, pero su actividad no es del todo clara. Oct-1 reprime el amplificador del HPV 18 independientemente de su sitio de unión (Hoppe, 1991), pero se ha encontrado que una mutación puntual en este sitio inhibe fuertemente la actividad del enhancer en células HeLa.

TEF-1

TEF-1 (Factor Transcripcional Enhancer) es una proteína de 426 aminoácidos contiene varios dominios, el dominio de unión al ADN se halla en el extremo amino terminal, rico en residuos de serina, cuenta con un dominio hidrófobo el cual constituye su dominio de dimerización el cual es rico en residuos de prolina, su dominio de activación se halla en el extremo carboxilo terminal, rico en residuos hidroxilo (Ser, Tre y Tir). Esta proteína se une a la secuencia consenso GGAATG. TEF-1 no esta presente en todas las formas celular. Mientras que TEF-1 puede contribuir a la función del enhancer del HPV, no es capaz de generar especificidad epitelial.

YY1

Es una proteína con dedos de zinc inicialmente se le llama “ying and yang 1” por habilidad tanto de reprimir como de activar el promotor P5 de un virus adenoasociado (AAV). Su actividad represora se ha asociado con su capacidad para desplazar a los activadores transcripcionales y para doblar al ADN. YY1 ha mostrado ser una proteína represora para HPV 18, pero mutaciones en ella que evitaban su unión a la LCR liberaban al promotor de la represión (Bauknecht, 1992). Es posible que YY1 pueda servir para mantener bajos niveles de transcripción viral que podría facilitar la infección a intervalos largos de tiempo.

Otras proteínas que se han podido relacionar con efectos importantes en la regulación tanto basal como tejido-específico son KRF-1 (Keratinocyte Restricted Factor-1), en HPV 18 interactúa con AP1 para activar la transcripción tejido-específico del virus (Mack, 1991). Sin embargo este sitio no es conservado, por lo que es poco probable que este implicado en la especificidad tisular de los virus genitales.

AP2

Son factores de transcripción que constituyen una familia de proteínas que regulan numerosos genes implicados en procesos de desarrollo, diferenciación celular y apoptosis. Participan en la diferenciación del epitelio regulando la transcripción de diferentes queratinas. Estos factores se unen sobre sitios consenso GCCC>NNGGC.

Tabla 1. Genes y proteínas del genoma del HPV.

Gen	Proteína	Función
L1	Proteína L1	Constituyente principal de la cápside
L2	Proteína L2	Proteína de la cápside, ensamblaje de viriones
E1	Proteína E1	Inicio de la replicación viral, helicasa, ATPasa. Regula con E2 la transcripción
E2	Proteína E2	Regulación transcripcional del virus, forma heterodímeros con E1 que estimulan la iniciación de la replicación
E4	Proteína E4 E1 [^] E4	Proteína tardía, maduración y liberación de las partículas virales, rompe la red de citoqueratinas citoplásmicas.
E5	Proteína E5	Proteína tardía hidrofóbica asociada a membrana, sinergiza la acción del factor de crecimiento epidermal (EGF) en el estímulo para la proliferación celular del epitelio
E6	Proteína E6	Transformante, se une a la proteína supresora de tumor p53 promoviendo su degradación, activa a la telomerasa.
E7	Proteína E7	Transformante, se une a pRB, p130 y C-Jun, activa la transcripción.
LCR		Secuencia reguladora de la transcripción, contiene el origen de la replicación viral y elementos de respuesta a factores de transcripción tanto virales (E2), como celulares.

Ciclo de Vida.

Los virus del papiloma son específicos de su huésped y presentan tropismo por las células epiteliales escamosas produciendo proliferación en piel y mucosas.

La infección por HPV se transmite por contacto directo, empieza en las células basales, las cuales son mitóticamente activas. Después, el virus puede permanecer ahí, integrarse al genoma o replicarse y producir partículas virales (Pfister, 1989).

El ciclo completo, que incluye la síntesis del ADN viral, la producción de las proteínas de la cápside viral y el ensamblaje de los viriones, se produce selectivamente en queratinocitos diferenciados (Pfister, 1989). Las células basales son poco activas en la expresión de proteínas virales ya que existen factores celulares que regulan negativamente la transcripción viral. Al migrar a la capa granular estas células se diferencian y ya no pueden dividirse. En estas células comienza la transcripción activa de secuencias virales tempranas y tardías, se sintetizan proteínas virales y las partículas virales se ensamblan en algunas de las células superficiales (Baker *et al.*, 1987).

El ciclo de vida del HPV está íntimamente ligado al programa de diferenciación del epitelio infectado, inicialmente infectan las células basales del epitelio, la cual constituye la capa celular del epitelio que se está dividiendo activamente. Solo una de las dos cadenas del ADN del HPV es activa transcripcionalmente, y es mantenido con un bajo número de copias en el núcleo de la célula huésped infectada y bajo la diferenciación del epitelio se mueve hacia su superficie.

En células completamente diferenciadas, el virus se replica con un alto número de copias y expresa entonces sus genes tardíos L1 y L2. Como son virus líticos, se vierten al medio extracelular dentro del epitelio escamoso.

La proteína E4 se asocia con los filamentos intermedios de la queratina, los cuales afectan la estabilidad mecánica de la red de queratina y puede facilitar la liberación de las partículas virales y codifica una serie de proteínas importantes para la replicación y

maduración viral (Shwarz *et al.*, 1985). La proteína E2 es un factor de transcripción que interactúa con la región LCR, principalmente actúa como un represor transcripcional de la expresión viral.

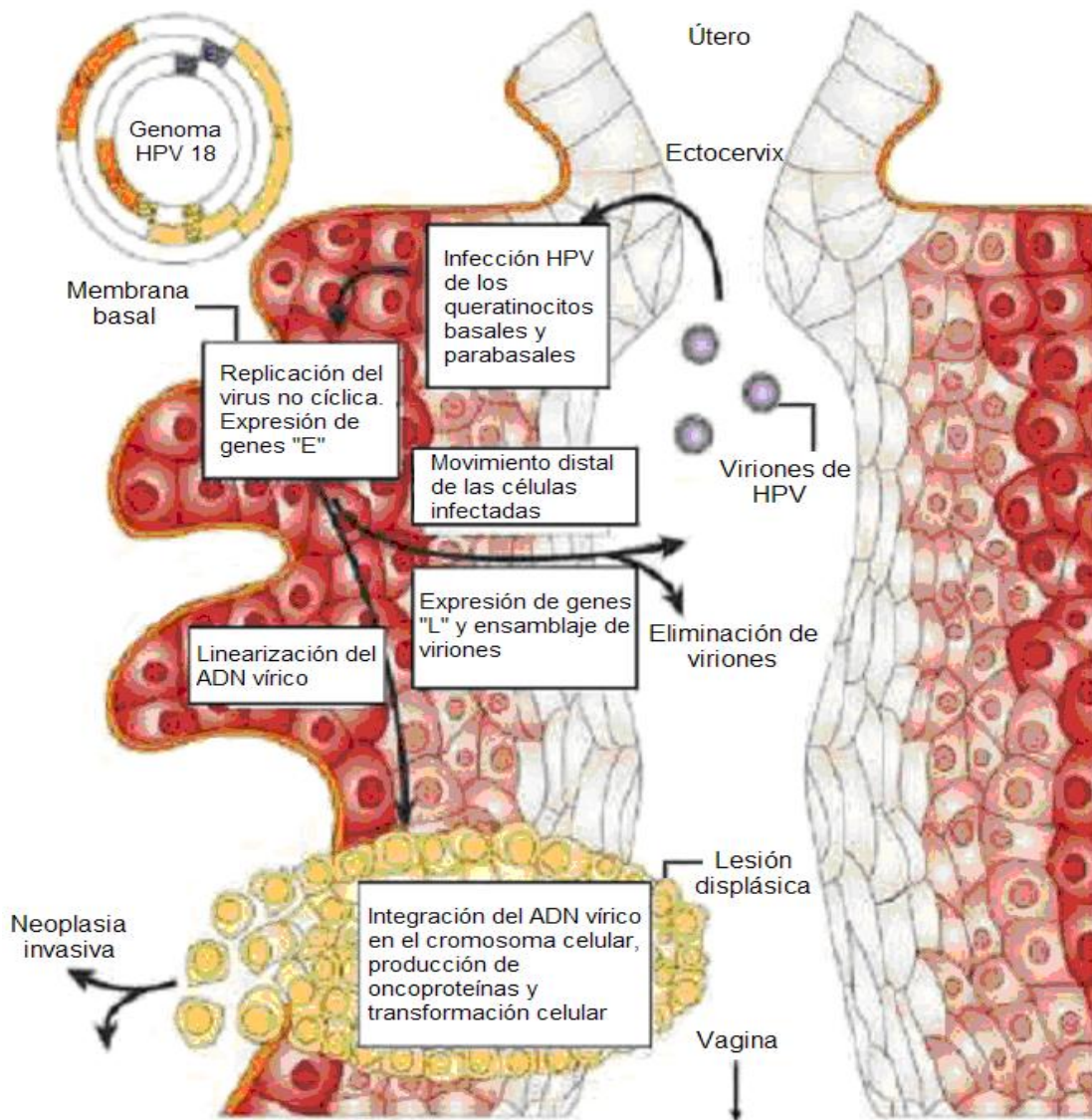


Figura 4. Infección por HPV. Dinámica de la Infección por HPV en el cuello uterino (tomado de Tindle, Nature Reviews Cancer, 2002).

En la expresión génica del virus la proteína E2 se asocia con E1 el cual tiene actividad de helicasa y esta interacción es necesaria para un eficiente origen de reconocimiento viral del genoma (Gius *et al.*, 1998). Uno de los eventos clave del HPV mejor estudiados

para inducir la carcinogénesis es la integración de su ADN en el genoma de la célula huésped.

E6 y E7 son las proteínas oncogénicas más importantes producidas por los HPV de alto riesgo están involucradas en la inmortalización y transformación de las células epiteliales. Estas proteínas son activamente expresadas en los tumores de cervix y las líneas celulares derivadas de ellos (Schwart *et al.*, 1985; Yee *et al.*, 1985). La integración al genoma del hospedero se da en la región E1-E2 del virus provocando su rompimiento por lo que ya no se sintetiza una proteína E2 funcional. La expresión de las oncoproteínas E6 y E7 se mantiene constante y algunas regiones del ADN del HPV son deletadas o perturbadas como es el caso de la región que contiene a E1 y E2. La pérdida de la expresión del represor transcripcional E2, trae como consecuencia la sobre expresión de E6 y E7 (se une al promotor p105), así como un incremento y estabilidad del ARNm de estos oncogenes después de la integración. Las células que expresan E6 y E7 después de la integración del genoma del HPV en la célula huésped tienen una ventaja de crecimiento selectiva sobre las células que tienen el genoma del HPV en forma episomal y tiene como consecuencia un aumento en la transcripción de dichos genes (Barbosa *et al.*, 1992).

La progresión maligna se ve favorecida por la pérdida de la función de la represión transcripcional de E2, lo cual es reforzado por los experimentos que muestran como la reexpresión de E2 en líneas celulares de cáncer cervical, causa supresión del crecimiento, con lo cual se puede observar que la continua expresión de E6/E7 en cáncer cervical es necesaria para mantener la transformación del fenotipo maligno (Berumen *et al.*, 1994).

Ya que los HPV no tienen la capacidad de codificar todas las proteínas que necesitan para su propia replicación y completar su ciclo viral, es necesario que utilicen la maquinaria de síntesis de la célula huésped.

La proteína E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 desactivándola, dando lugar a su degradación, en un proceso dependiente de la ubiquitina (Muñoz *et al.*, 1999). Activa la telomerasa, que debe expresarse para que las células superen el punto crítico

después del cual dejarían de dividirse (Berumen *et al.*, 1994). E6 tiene muchas interacciones con proteínas celulares no obstante su acción clave es la inhibición en la función de la proteína p53 como supresor de tumor. Para inhibir la función de p53, E6 requiere de una proteína celular llamada E6-asociada (E6AP). En células no infectadas la degradación de p53 mediada por ubiquitina es provocada por la proteína mdm-2 mientras que en células infectadas el complejo E6-E6AP reemplaza mdm-2 en el control de los niveles celulares de p53. Esta modificación acorta la vida media de p53 y reduce sus niveles en células de carcinoma cervical (Werness *et al.*, 1990). Es bien sabido que el aumento de niveles de p53 juega un papel crítico en la expresión de genes que arrestan el ciclo celular, permitiendo la reparación del ADN o la activación de la vías apoptóticas (Smith, 1995). Sin embargo las células que mantienen la expresión de E6, expresan bajos niveles de p53, alterando la respuesta normal al ADN dañado y favorece la acumulación de mutaciones en el genoma celular.

E7 se asocia con la proteína del retinoblastoma (pRB) lo que libera al factor transcripcional E2F, que se halla unido a pRB (20), pRB que es un supresor tumoral e interviene en la regulación de la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. Cuando pRB se une a E7 da lugar a la liberación de E2F y la progresión sin control del ciclo celular y es responsable de la inestabilidad genómica que contribuye a la transformación celular (Crook *et al.*, 1998).

Integración del ADN.

El ADN de los HPV se puede encontrar en forma extracromosomal o episomal en lesiones precursoras cervicales benignas. En los tejidos con cáncer pueden contener ambos el ADN del HPV episomal o integrado al mismo tiempo, aunque la integración ocurre mas frecuentemente en el HPV 18 que en el HPV 16 (Crucius *et al.*, 1997). Durante la integración del HPV al ADN, el genoma vírico rompe le región de E1/E2, lo cual lleva a la pérdida de E1 y regiones de E2. La pérdida de E2 trae como resultado la expresión controlable y aumentada de las proteínas oncogénicas E6 y E7, lo cual lleva a la transformación maligna de la célula huésped y a la formación de tumores (Doorbar, 1991).

Regulación de la Transcripción.

La transcripción temprana del HPV es dependiente de la formación de complejos multiproteínicos asociados a la ARN polimerasa II en la caja TATA. En esta unión interactúan proteínas celulares (que se asocian a la caja TATA o TBP), que permiten el anclaje de la ARN polimerasa II y el inicio de la transcripción (Sawadogo, 1998). Al ser dependiente de la caja TATA, la transcripción basal del HPV se encuentra bajo la regulación de p53 el cual se asocia a las TPB impidiendo su función y por lo tanto tiene un efecto represor, de hecho cualquier bloqueo a la formación del complejo multiprotéico en la caja TATA tiene como resultado la inhibición de la transcripción.

La proteína viral E2 juega un papel central en la regulación genética del HPV, reprimiendo o activando la transcripción, dependiendo de la cercanía entre sus sitios de interacción y la caja TATA (Romanczuk *et al*, 1997). Existen dos sitios E2 (ACCGN-4+-CGGT) a 3-4 pb de la caja TATA, lo cual trae como consecuencia la represión del promotor p105 (Moskalud *et al*, 1990).

La activación de E2 se debe a la facilidad de su extremo amino de interactuar físicamente con factores celulares como SP1, E2 se une en forma dimerica a su sitio blanco, pero se requiere de por lo menos dos sitios E2, es decir un tetrámero de E2 para activar la transcripción (Chellapan *et al*, 1992).

Las infecciones por HPV pueden progresar a cáncer, pero muchas permanecen como lesiones precursoras y presentan regresión, los factores que determinan estas características son poco conocidos. La transformación por HPV depende de las oncoproteínas E6 y E7, su transcripción es activa en células epiteliales en diferenciación y esta se encuentra reprimida en células indiferenciadas por los factores CDP y YY1, los cuales en colaboración con las desacetilasas de histonas (HDACS), alteran la conformación de la cromatina compactándola para reprimir la transcripción, también existen otros factores que incrementan la transcripción oncogénica como los glucocorticoides y la progesterona (Shwarz *et al*, 1995; Crook *et al*, 1998).

La progresión tumoral puede ser el resultado de la expresión de las oncoproteínas a través de la inducción por hormonas esteroides (Pater *et al*, 1988), por delección de silenciadores transcripcionales o por integración del genoma del HPV al ADN del huésped. La transcripción de E6 comienza con su promotor p105 el cual es regulado por un sitio de unión para Sp1 y dos para la proteína E2. La actividad de p105 es estimulada por un enhancer el cual posee sitios de unión para diversos factores celulares como AP1, NF1 (Benard *et al*, 2003).

Epigenética

El término epigenético se define como los cambios heredables de la expresión génica que tiene lugar sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN. De tal forma que un mecanismo epigenético es un sistema que utiliza selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Los cambios epigenéticos influyen en el fenotipo sin alterar el genotipo (Wolffe *et al*, 1999). Las modificaciones epigenéticas implican modificaciones por adición de grupos funcionales (metilos, acetilos, fosfatos) o proteínas (ubiquitina, SUMO) al ADN o de proteínas asociadas, con regulación transcripcional como activar, inhibir o modificar la expresión de genes (Bird A. 2002). Por lo tanto, juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario, el cáncer y la respuesta inmune. Los cambios epigenéticos mejor estudiados son la metilación del ADN y la acetilación de histonas (Rodríguez *et al*, 2004), siendo esta última la que afecta la estructura local de la cromatina regulando la transcripción genética (Bird, *et al*, 1999). Sin embargo, se ha observado que una alteración habitual en los cánceres es una disminución general del estado de metilación del ADN (Pelucchi *et al*, 2003).

Acetilación, Desacetilación y Metilación de Histonas.

La cromatina es la estructura en la que el ADN se organiza y empaqueta en el núcleo de la célula eucarionte. La unidad estructural fundamental es el nucleosoma, está formado por ADN genómico enrollado en un octámero de histonas, formado por un tetrámero de H3/H4 y dos dímeros de H2A y H2B, más una molécula de H1 (Nakao, 2001). En los organismos eucariontes la actividad transcripcional es generalmente impedida por el empaquetamiento nucleosomal. Activadores y represores tienen influencia sobre la

expresión de los genes por el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina en las regiones promotoras (Richards *et al*, 2002).

Las histonas juegan un papel que va mas allá de su simple función estructural, en realidad se convierten en verdaderas reguladoras de la transcripción a través de modificaciones postraduccionales (después de la síntesis de proteínas), como la metilación, acetilación, ubiquitinación y fosforilación. En general se puede afirmar que la metilación se relaciona la mayoría de la veces con el empaquetamiento de los nucleosomas (represión de genes), mientras que la acetilación se relaciona con procesos de desempaquetamiento y transcripción en la expresión de genes (Jenuwien, 2001).

Las alteraciones en la estructura de la cromatina, a través de la modificación postraduccional de las histonas tienen consecuencias directas sobre la regulación de la expresión génica. Se ha sugerido que el patrón de modificaciones en las histonas actúa como un código, dictando las interacciones nucleosomales y la asociación con otras proteínas cromosómicas o no histónicas que promueven el empaquetamiento y la regulación de la expresión del genoma.

Principalmente, las modificaciones en los extremos amino terminal de las histonas H3 y H4 tienen una función importante en la producción de los cambios estructurales en la cromatina que regulan la actividad génica. La hipoacetilación de las histonas H3 y H4 es característica en regiones del genoma transcripcionalmente inactivas. El estado de acetilación de las histonas es regulado por la actividad de las acetilasas de histonas (HAT) y de las desacetilasas de histonas (HDCA) (Wade, 2001). La acetilación de las histonas H3 y H4 incrementa la expresión de genes promoviendo una estructura abierta de la cromatina. Las HDACs contribuyen a la formación de complejos correpresores transcripcionales como Sin3 y Mi-2/NuRD que participan en el remodelamiento de la cromatina cambiando la posición de los nucleosomas y restringiendo el acceso de los factores de transcripción a promotores (Nakao, 2001).

Los residuos de lisina K4 y K9 de H3 pueden ser acetilados y metilados. La metilación en K4 y acetilación en K9 se encuentran en cromatina activa, mientras que la metilación

en K9 se correlaciona con el silenciamiento de genes. (Richards, 2002). La acetilación es reversible gracias a la acción de las HDACs, las cuales se encuentran presentes en complejos que tiene actividad represora. (Lewin, 2004).

La metilación de las histonas y del ADN se asocia con el silenciamiento de los genes debido a que algunas HNTs presentan sitios de unión a regiones CpG o de una forma alternativa la metilación de las colas de histonas podría reclutar a la enzima encargada de metilar los sitios CpG

Metilación y Desmetilación del ADN.

La metilación del ADN es un proceso sumamente dinámico, el cual es regulado de una forma sumamente eficiente en donde las secuencias que no están metiladas pueden ser metiladas y los grupos metilos pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de la metilación y la desmetilación. Tiene influencia en la conformación de la cromatina, los cambios en el estado de la metilación son algunas de las alteraciones moleculares más común en neoplasias humanas (Bird, 2002). La metilación de los dinucleótidos CpG puede influenciar en la transcripción como en la replicación del ADN en organismos eucarióticos (Wolffe, 1999). La metilación del ADN causa interferencia con la unión de varios factores de transcripción, dando como resultado un silenciamiento de la expresión genética (Wolffe, 1999; Bird, 2002).

Este es un sistema que utiliza selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosinas en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina que regulan la expresión génica (Rodríguez *et al*, 2004). La metilación del ADN es un mecanismo adicional de regulación de la transcripción de HPV, este mecanismo de regulación epigenética probablemente traiga consecuencias en la expresión viral de los oncogenes, el ciclo de vida y la progresión carcinogénica en lesiones con HPV (Badal *et al*, 2003).

Durante la carcinogénesis se ha observado con frecuencia una hipometilación global o regional e hipermetilación en islas CpG, esta metilación reprime la expresión genética,

por interferencia directa al impedir la unión de los factores de transcripción ó por unión de una familia de proteínas que reconocen ADN metilado y reclutan HDACS, las cuales favorecen la condensación de la cromatina y por lo tanto reprimen la transcripción. Parece ser que este mecanismo es el blanco de modificación por los complejos entre HDACS y los factores de transcripción CDP y YY1 (Bernard *et al*, 2002).

La metilación del ADN es un proceso importante en la regulación epigenética, la conformación de la cromatina regula la expresión de genes (Jones *et al*, 2001), participa en la regulación de etapas tempranas del desarrollo, así como en la inmovilización de transposones, manteniendo una mayor estabilidad (Mauricio, *et al*, 2004).

La metilación del ADN puede regular la expresión génica por dos mecanismos, por interferencia directa en la unión de los factores de transcripción con secuencias blanco, evitando su activación o por la unión de proteínas que reconocer al ADN metilado, conocidas con "Methyl-CpG-binding proteins", en donde se unen corepresores y estos además reclutan desacetilasas de histonas, generando una cromatina altamente compacta (Sushma *et al*. 2004). Dentro de estas proteínas destacan MeCp2, MBD2 y MBd3 (Szyf, 2003).

En los vertebrados la única modificación epigenética en el ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. Las 5-metilcitosinas (5mC) en el ADN de mamíferos están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' y en la cadena complementaria en el dinucleótido 3'-GpC-5'. También pueden estar metiladas secuencias no CpG como 5'-CpNpG-3' o no simétricas como 5'-CpA-3' y 5'-CpT-3', pero con menor frecuencia (Costelo, 2001).

La presencia de la 5mC produce un cambio en la doble cadena del ADN, lo cual podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica en donde el estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, existiendo una relación entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica (Jones, 2001)

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano, en un gran porcentaje (98%) los CpG están presente una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de que van desde 200pb hasta varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG, las cuales reciben el nombre de “islas CpG”. Aproximadamente, de un 60 a 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las islas CpG localizadas en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están (Wolfe, 2001). Las islas CpG se localizan generalmente entre la región central del promotor y el sitio de inicio de la transcripción, observándose represión en la expresión del gen cuando se encuentran hipermetiladas (Bird, 2002).

Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo son reprogramados en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación de *novo* activa en estos estadíos (Kafri *et al*, 1992). La metilación de *novo* puede ocurrir en las células somáticas adultas, un numero significativo de islas CpG son susceptibles de metilación progresiva en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos (Ehrlich, 2001). Sin embargo se ha encontrado patrones de metilación anormales en muchos tipos de cáncer, los cuales conducen la inactivación de genes supresores de tumores y a la inestabilidad del genoma (Bird *et al*, 1999).

La metilación del ADN es catalizada por las ADN metiltransferasas en donde se realiza la transferencia de un grupo metilo de la S adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina (Doerfler W. 1983). Estas enzimas se han clasificado en dos grupos: Las ADN metiltransferasas de mantenimiento (DNMT1) y las metilasas de *novo* (DNMT3A y DNMT3B) (Bird *et al*, 2002).

Las ADN metiltransferasas de mantenimiento ocasionan que el ADN sea metilado al inicio de la replicación, la cadena nueva es únicamente la metilada, siendo heredados los patrones de una manera semiconservativa. La DNMT1, se expresa en tejidos somáticos y su principal actividad se observa durante la replicación del ADN, interactuando con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), proteína que ancla a la ADN polimerasa en la horquilla de replicación (Chiang *et al*, 1977). La

DNMT1 también está implicada en ciertos tipos de metilación de *novo*, siendo específica para el dinucleótido CpG, también interacciona con complejos proteicos implicados en la represión transcripcional que incluyen a las desacetilasas de histona (HDAC) (Bestor, 2002).

Las DNMT no solo ejercen su función en la represión transcripcional metilando al ADN, su interacción con las HDAC es independiente de la actividad de metiltransferasa. Parece ser que las DNMT son dirigidas a regiones específicas del genoma a través de interacciones proteína-proteína, su asociación con factores de transcripción específicos, proteínas de unión a histonas metiladas o a correpresores como RB/E2F, en donde su actividad de ADN metiltransferasas participe en la represión transcripcional (Bestor, 2002).

Se han propuesto dos posibles procesos para la desmetilación del ADN. Uno que es pasivo y es el resultado de la ausencia de metilación de mantenimiento durante varios ciclos de replicación del ADN. El segundo sugiere la existencia de un proceso activo de desmetilación, proceso que se realiza por una desmetilasa de ADN, la cual podría estar encargada de deshacer y modificar la escritura del código antes de su lectura, pero la existencia de tal enzima es aún controversial, siendo un candidato en potencia la MBD2 (Bhattacharya, 1999; Razin *et al*, 1977). Por otro lado, se ha propuesto que la desmetilación activa sea el resultado de un proceso de reparación del ADN, en donde un 5-metilcitosina ADN glicosilasa realice esta actividad (Zuh, 2000).

Epigenetica y HPV.

La integración del ADN del virus a la célula hospedera se da después de un cierto tiempo de persistencia, esta integración se considera como un evento temprano en la carcinogénesis cervical (Ross *et al*, 1993). Una vez establecida la infección, el virus mantiene su genoma en forma episomal produciendo un bajo número de copias (entre 10 y 200) en las células basales del epitelio. Durante esta etapa se producen las proteínas de expresión temprana, necesarias para la replicación del ADN viral, así como el mantenimiento de este en estado episomal (Doorbar, 2005).

En infecciones persistentes el ADN viral es finalmente integrado al genoma de la célula hospedera, con lo que se convierte en un blanco preferencial para la metilación y la inactivación transcripcional, (Turan *et al*, 2006). Sin embargo, evidencias experimentales muestran que el episoma podría estar frecuentemente metilado (Badal 2003).

Dentro de las primeras evidencias sobre la importancia de la metilación El estudio de la metilación de los sitios CpG en el HPV fue realizado por Burnett en 1984 el cual sugirió que la metilación tiene un papel en el control de la expresión de los genes virales dentro de las células hospederas. Dentro de las primeras evidencias de la importancia de la metilación de DNA viral fueron realizados por Rosl y colaboradores en 1993 los cuales mostraron que células transfectadas con HPV16 que contaba con el genoma metilado invitro presentaban represión en la transcripción del DNA. Badal y colaboradores en el 2003 encontraron que la frecuencia de sitios susceptibles de metilación dentro de los HPVs son mucho menor de los esperados.

Recientemente se ha mostrado que la metilación en el DNA del HPV 16 y 18 se presenta regularmente in vivo en células de pacientes con cáncer cervical in situ y en cultivos celulares. Otras evidencias sugieren que el genoma de estos virus presentan patrones de metilación diferentes (Badal, *et al*, 2003, 2004; Kim *et. al.* 2003; Van Tine *et al*, 2004; Kalantari *et al*, 2004, Wiley *et al*, 2005).

Kalantari en el 2004 encontró que del 10 al 20% de los sitios CpG en la región larga de control (LCR) en muestras de infecciones asintomáticas se encuentra metilado, la metilación disminuye en lesiones precursoras, mientras que en lesiones de alto grado y en carcinomas existe un aumento de metilación, también encontraron que existe una metilación mayor al 50% en la región L1.

Kim y colaboradores en el 2003 encontraron que existe transición entre la hipermetilación de infecciones asintomáticas e hipometilación en lesiones de bajo grado, esto se vio correlacionado con la evidencia de que cultivos de células W12 mantenían el DNA viral de forma episomal hipermetilado cuando se encontraban en un estado no diferenciado, sin embargo cuando éstas se diferenciaban el DNA pasaba a

un estado de hipermetilación. Esto soporta la hipótesis de que HPV 16 puede reprimir la transcripción sobre la infección. En procesos iniciales de transformación se ha encontrado no metilación en muestras clínicas (Kalantari, *et al*, 2004) y en cultivos celulares (Kim *et al*, 2003).

En carcinomas el DNA del HPV16 no se encuentra en forma episomal, si no se integra al DNA celular para su replicación, lo cual se puede correlacionar con un incremento en la metilación (Kalantari *et al*, 2004; Wiley *et al*, 2005), desde que el DNA se integra a los cromosomas celulares es un blanco preferencial para la metilación y la inactivación transcripcional (Doerfler *et al*, 2001). Esto propone la posibilidad de un mecanismo de reconocimiento específico que lleva a la activación selectiva de unos pocos genomas HPV16 en cada célula para el mantenimiento del estado neoplásico (Van Tine *et al*, 2004).

Badal y colaboradores en el 2004 realizaron el análisis de los patrones de metilación en líneas celulares provenientes de cánceres cervicales y diferentes clonas de Hela, encontrando que en las clonas de Hela la LCR se encuentra desmetilada con excepción de la posición 7318, mientras que la región L1 se encuentra metilada casi en su totalidad, en el caso de las muestras, en la región larga de control la metilación es heterogénea entre ellas y la región L1 se encuentra metilada casi en su totalidad.

Turan y colaboradores en el 2006 realizaron investigaciones sobre el estado de metilación del genoma del HPV 18, específicamente en L1 encontrando que en infecciones asintomáticas e infecciones precancerosas o precursoras el DNA la LCR del HPV 18 se encontraba no metilada, sin embargo la región L1 en carcinomas cervicales se encontró fuertemente metilada.

JUSTIFICACION

La metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica de los HPVs. Su desregulación es debida a la presencia de procesos cancerígenos. A pesar de que, dentro de los HPV de alto riesgo el HPV 18 ocupa el segundo lugar como agente etiológico de cáncer de cérvix a nivel mundial, está asociado con las formas mas agresivas de neoplasia cervical intraepitelial. Y debido a que se ha estudiado poco sobre los patrones de metilación de los sitios CpG del HPV 18 en la región larga de control (LCR). Es de gran importancia investigar e identificar la existencia de los patrones de metilación en la LCR y L1 en líneas celulares con HPV18 y determinar si existen diferencias o similitudes entre ellas en sus patrones de metilación y considerar la posibilidad de que las oncoproteínas virales puedan modular directa o indirectamente la maquinaria de metilación para silenciar genes celulares que pueden intervenir con la promoción de tumores.

HIPOTESIS

El patrón de metilación de la región larga de control (LCR) y de L1 será similar en líneas celulares con HPV18 y con transformación maligna como son HeLa, Vipa y Calo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar los patrones de metilación en la región larga de control (LCR) y L1 en diferentes líneas celulares con HPV 18 integrado.

Objetivos específicos

Estandarizar la técnica de modificación de ADN con bisulfito de sodio y su amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos, clonación y secuenciación en líneas celulares de carcinomas cervicales que tienen HPV 18.

Identificar y comparar los patrones de metilación de las diferentes líneas celulares con HPV 18 integrado, con los reportados previamente en la literatura.

METODOLOGIA

Líneas Celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de carcinoma cervical: HeLa la cual fue establecida a partir de una paciente afroamericana con adenocarcinoma cervical, Vipa y Calo son líneas celulares provenientes de mujeres mexicanas con adenocarcinoma cervical (Hidalgo *et al*, 2003), todas con presencia de ADN de HPV tipo 18. Se cultivaron en laboratorio bajo las siguientes condiciones: 5% de CO₂ en medio DMEM F12 (GIBCO) complementadas con 10% de suero fetal bovino (ITY CLONE). Se sembraron 2 x 10⁶ células (un millón por caja p100 y se dejaron crecer por cuatro días, obteniéndose un total de 10 x 10⁶ células.

Extracción de ADN.

La extracción del ADN de las líneas celulares se realizó mediante el empleo del kit Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega Inc.) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante:

Se adicionaron 600 µl de solución de lisis nuclear y se incubó a 65° C por 60 minutos añadiendo 17.5 µl de proteinasa K. En seguida se agregaron 1.5 µl de RNAsa y se dejó actuar por 30 minutos a 37° C. Después se agregaron 200 µl de solución precipitante de proteínas, agitando para homogeneizar. La solución se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Al sobrenadante obtenido se agregaron 500 µl de isopropanol, se agitó y centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Se adicionaron 600 µl de etanol al 70 %, agitando por inversión y centrifugaron 1 minuto a 14 000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó por decantación y los tubos se colocaron de forma invertida sobre una gasa estéril. Por último a los ADNs precipitados se les adicionaron 50 µl de solución rehidratante, se incubaron por 1 hora a 65 ° C, se almacenaron a -20° C y se cuantificaron en un biofotómetro para conocer la cantidad de ADN obtenida.

Amplificación de LCRs

Antes de modificar el ADN se realizó una PCR de las LCRs de las diferentes líneas celulares con el fin de conocer si estas regiones se encontraban íntegras, para lo cual se emplearon los oligonucleótidos F7201 (5' TGTATGTTGCCATTGTATGG 3') y R124 (5' GGATCCTCAAAGCGGCCAT 3'), que amplifican de la posición 7220 a la posición 124 del HPV 18.

La reacción de PRC se llevo a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2.5 μ l de buffer 10X de Taq Gold, 4 μ l (0.2 mM) de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 μ l de cada uno de los primers (1 pMol/ μ l), 2.5 μ l de MgCl (25 mM), 0.2 μ l (1U) de Ampli Taq Gold (Perkin Elmer), 5.8 μ l de H₂O y 500ng de ADN. La reacción de PCR fue programada de la siguiente manera: 5 minutos a 95° C, seguido por 38 ciclos de amplificación: desnaturalización a 95° C por 1 minuto, alineamiento a 60° C, por 1 minuto y extensión a 72° C por 50 segundos. Con una extensión final a 72° C por 5 minutos.

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL).

Modificación de ADN con Bisulfito de Sodio

La modificación con bisulfito de sodio tiene como fundamento la conversión de las citosinas en uracilo y posteriormente estos en timinas, excepto las que se encuentren metiladas, dando como un resultado que al ser secuenciados estos productos, las citosinas que se encontraban metiladas se leen como citosinas, y las que no, se leen como timinas.

Se modificaron 2 μ g de ADN mediante la técnica de tratamiento con bisulfito de sodio, empleando el Kit EZ ADN Methylation de Zymo Research, de la siguiente manera: se adicionaron 5 μ l de buffer de dilución-M a la muestra de ADN y se ajustó a un volumen total de 50 μ l con agua estéril, se mezcló, e incubó a 37° C por 15 minutos. Después de la incubación se adicionaron 100 μ l de Reactivo de Conversión CT recién preparado. Se incubó en la oscuridad a 53° C de 12-16 hrs, posteriormente en hielo por 10 minutos.

Se adicionaron 400 μ l de buffer de unión M, se colocó la muestra en una columna, la cual es soportada por un tubo colector de 2 ml. Se centrifugó 30 segundos a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 200 μ l de etanol absoluto a la columna, se centrifugó 30 segundos en las mismas condiciones y se descarto el sobrenadante. Se adicionaron 200 μ l de buffer de desulfonación M, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó 30 segundos. Nuevamente se adicionaron 200 μ l de etanol absoluto y se centrifugó por 30 segundos, este paso se repitió dos veces. Por último, se agregaron 50 μ l de buffer de elusión y el ADN se guardó a -20° C.

PCR de ADN modificado con Bisulfito de Sodio

La amplificación del ADN modificado se realizó con oligonucleótidos específicos para la LCR. Se emplearon tres juegos de oligonucleótidos: uno para la amplificación de la región 5' del gen L1: 18Msp4F (posición 5943-5959; 5' GGTTAGTTTTTAGGTGTTGGT 3') y 18Msp5R (posición 6461-6482 5' CACACAACCTACCAAATAAAACA 3') obteniendo un fragmento de amplificación de 540 pares de bases. Dos para la región larga de control: 18Msp8F (posición 7753-7781; 5' TGTTTAATATTTTGTGTTATTTTAAATATG 3') y 18Msp8R (posición 186-161; 5' TATCTTACAATAAAATATTCAATTCC 3') con el cual se amplificó la región del promotor de la LCR y parte del gen E6, obteniendo un fragmento de amplificación de 300 pares de bases. El segundo 18Msp10F (posición 7282-7293; 5' TAAAATATGTTTTGTGGTTTTGTG 3') y 18Msp10R (posición 7747-7721; 5' ATAATTATACAAACCAAATATACAATT 3'), con el cual se amplificó la región del Enhancer obteniendo un fragmento de 460 pares de bases (Badal, *et al*, 2004). Todos los juegos de oligonucleotidos se realizaron de acuerdo a la secuencia del genoma del HPV18 asumiendo que todos los residuos de citosinas no metiladas fueron convertidas a uracilo.

La reacción de PRC se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l conteniendo 2.5 μ l de buffer 10X de Taq Gold, 4 μ l (0.2 mM) de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos (1 pMol/ μ l), 2.5 μ l de MgCl (25 mM), 0.2 μ l (1U) de Ampli Taq Gold (Perkin Elmer), 5.8 μ l de H₂O y 5 μ l del ADN modificado. La reacción de

PCR fue programada de la siguiente manera: 9 minutos a 94° C, seguido por 44 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 53° C por 30 segundos y extensión a 68° C por 45 segundos, con una extensión final a 68° C por 7 minutos.

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL).

Clonación de los productos de PCR del ADN modificado

Los productos amplificados fueron clonados con el Kit TOPO TA cloning de Invitrogen. El Kit topo cloning permite la clonación en un solo paso, el vector (pCR4-topo) viene linearizado, posee extremos cohesivos con una T que sobresale en el extremo 3' y tiene una topoisomerasa unida covalentemente. Por otro lado la Taq Gold deja al producto de PCR también con los extremos cohesivos, una A en el extremo 3'. Esto permite la inserción del producto de PCR al vector en forma eficiente (Fig. 5), empleando el siguiente protocolo: A un tubo de 1.5 µl se adicionaron 2 µl de agua estéril, 1 µl de sal (1.2 M NaCl y 0.06 M MgCl₂), 1 µl de vector TOPO, 2 µl de producto de PCR. Se mezcló la reacción e incubó a temperatura ambiente por 20 minutos.

Transformación bacteriana.

Se alicuotaron 25 µl de células TOPO en un tubo de 1.5 ml y se transfirieron 4 µl de la mezcla del vector mas el producto de PCR, se colocó la reacción en hielo por 30 minutos. Posteriormente se le dio un choque térmico a las bacterias, para lo cual, se transfirieron a un baño María por 30 segundos, acto seguido, se pusieron en hielo por dos minutos más, posteriormente se adicionaron 100 µl de medio SOC a cada tubo. Después se incubaron a 37° C ~275 rpm por 60 min. Se plaquearon en medio LB y kanamicina (50µg/ml), incubándose a 37° C toda la noche.

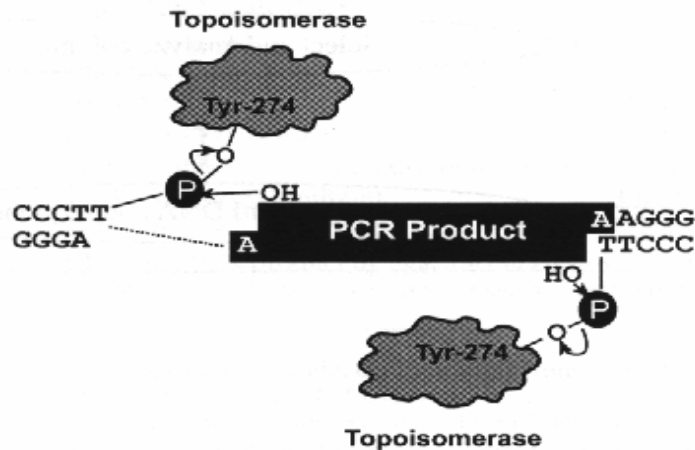


Fig 5. Vector topo. El vector cuenta con extremos cohesivos, una T en sus extremos 3', el producto de PCR tiene como extremos cohesivos una A en su extremo 3'. La topoisomerasa unida covalentemente al vector cataliza la ligación y asegura la clonación del producto de PCR dentro del vector TOPO.

PCR de las colonias bacterianas

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se retiraron de la incubadora y se realizó PCR de cada una de las colonias empleando el siguiente protocolo: 2.5 µl de buffer 10x; 4 µl de dinucleótidos (dNTPs); 1.25 mM, de MgCl₂; 25mM, oligonucleótidos M13F y M13R; 14.1 µl de H₂O y 0.2µl de taq polimerasa.

El programa de amplificación empleado para las colonias fue el siguiente: 7 minutos a 94° C, seguido por 30 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 60° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto. Con extensión final a 72° C por 7 minutos. La clonación de los productos de PCR se verificó realizando el corrimiento de estos en un gel de agarosa al 2%, por electroforesis, y teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL). Los productos esperados fueron de diferentes tamaños dependiendo del oligonucleotido empleado: 18Msp4F/5R, 700 pb, 18Msp8F/R, 450 pb, 18Msp10F/R, 610 pb.

Análisis de secuencias nucleotídicas de los fragmentos geonómicos clonados

Limpieza de los productos de PCR por el método EXO-SAP

En un tubo se adicionaron 9.5 μ l de PCR-ADN (80-200 ng), 1 μ l 10X SAP, 1 μ l SAP, 0.5 μ l Exonucleasa 1. Se incubó 60 min. a 37° C y posteriormente se incubó por 30 min. a 72° C en baño María. Finalmente se enfrió a 4° C y se guardó a -20° C.

Reacción de PCR para Secuenciación

En un tubo de 0.2 ml se colocaron 2.5 μ l de exo-sap ADN. 2 μ l de oligonucleótidos M13R (1.6 μ M), 2 μ l de agua, 2 μ l 5X buffer y 1.5 μ l de Big Dye sequencing. La reacción de secuencia fue la siguiente: 3 minutos a 94 °C, seguido por 24 ciclos de amplificación: desnaturalización a 96 °C por 30 segundos, alineamiento a 50 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 4 minutos. Se dejó enfriar a 4 °C.

Limpieza de productos amplificados en la reacción de Secuenciación

A cada tubo de la reacción de secuenciación se adicionaron 3 μ l de acetato de sodio 3M pH 4.6, 32.5 μ l de etanol 95% y 14.5 μ l de agua destilada. Se agitó e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, enseguida se centrifugó 20 minutos a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida fue lavada con etanol 70%, se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 5 minutos. Por decantación fue eliminado el sobrenadante se dejó secar y se resuspendió en 30 μ l de formamida Hi-Di.

Secuenciación de productos amplificados

Los productos finalmente fueron desnaturalizados a 96° C por 2 minutos, inmediatamente se colocaron los tubos en hielo y se enviaron a secuenciación en el equipo AB PRISMA 3100 de Applied Biosystem, para su posterior análisis e interpretación.

RESULTADOS

Amplificación de LCRs de HeLa, Vipa y Calo.

Después de la extracción de ADN de las tres líneas celulares se procedió a la amplificación de las LCRs de éstas, encontrando que dichas regiones amplificadas no mostraban diferencia alguna. El fragmento observado fue de 800 pb, el cual era esperado, lo cual permitió establecer que dicha región se encontraba íntegra y se podría continuar con el protocolo preestablecido para la modificación y amplificación de las regiones CpG de interés para el análisis del estado de metilación (figura 6).

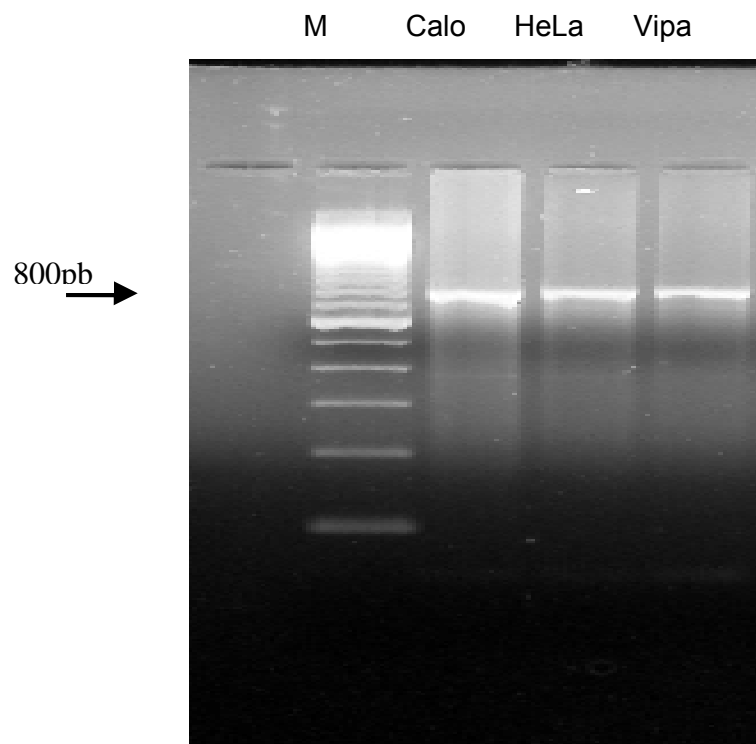


Figura 6. Amplificación de las LCRs. Se puede observar que estas regiones en Calo, HeLa y Vipa se encuentran íntegras, ya que el tamaño de los fragmento es el esperado.

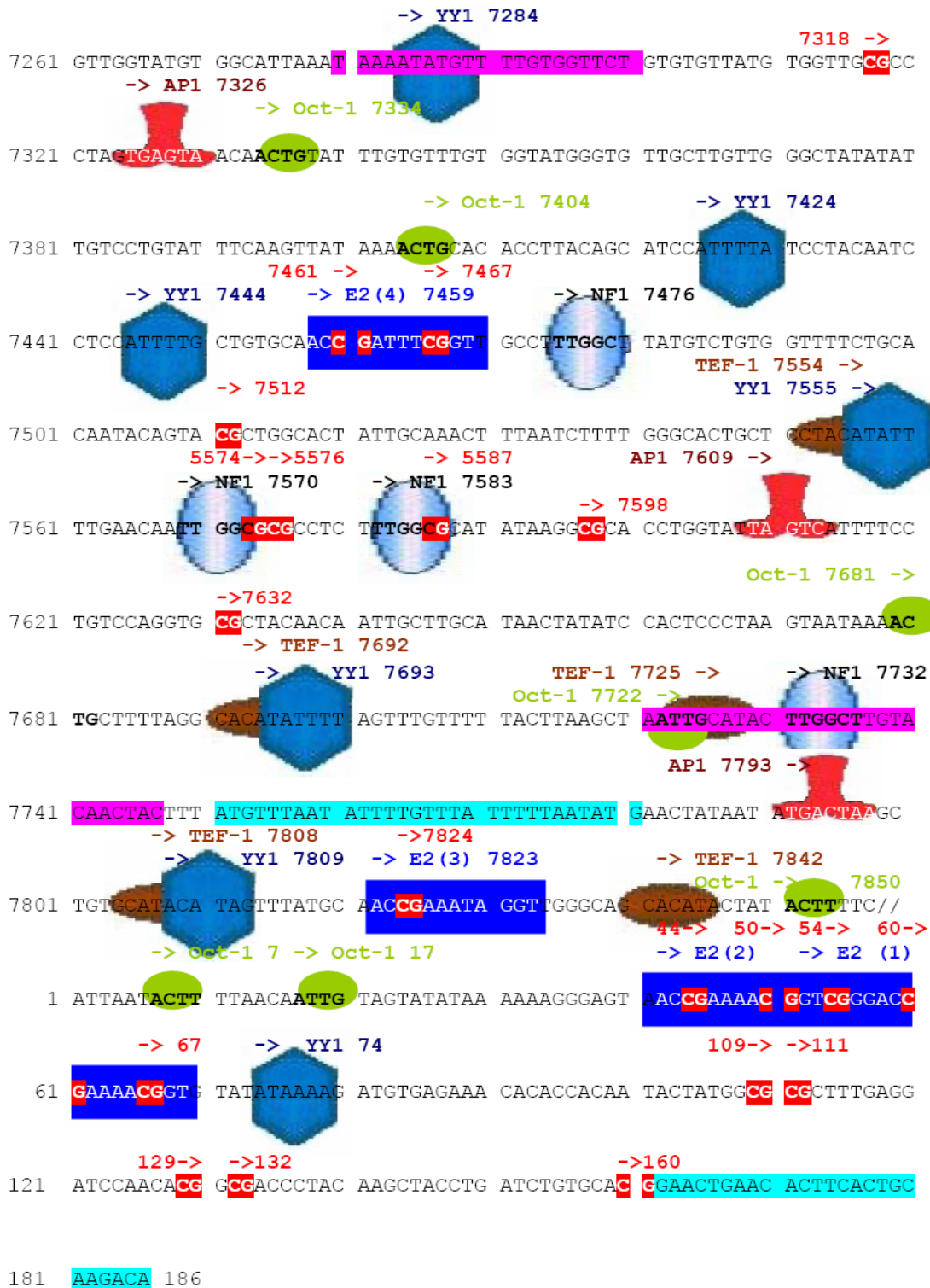


Figura 8. Representación esquemática de la secuencia genética de la LCR, factores de transcripción y sitios CpG. Secuencia genómica de la LCR en donde se pueden observar los diferentes factores de transcripción, sus posiciones y sitios CG dentro de la LCR.

Durante la extracción de ADN se manejaron las muestras con y sin empleo de proteínasa K en las 3 líneas celulares. Esto se realizó con la finalidad de conocer si existía un mayor rendimiento en la cantidad de ADN durante la extracción, encontrándose que en el caso de HeLa y Vipa éste fue mayor cuando las muestras se procesaron con proteínasa K. En el caso de Calo se observó que el rendimiento con ambos tratamientos fue igual.

La amplificación del ADN modificado con los oligonucleótidos específicos no tuvo ningún problema, observándose los fragmentos esperados para cada uno de ellos en las tres líneas celulares, aunque las bandas donde se empleó el ADN extraído con proteínasa K fueron más fuertes que en los casos donde no se utilizó proteínasa K, Figura 9 y 10.

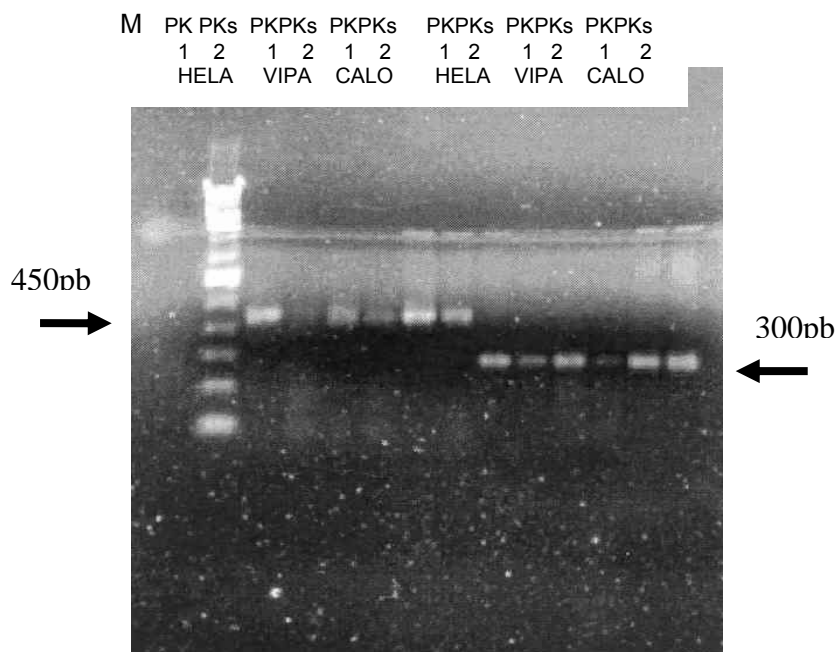


Figura 9. Amplificados del enhancer y promotor de la LCR. Amplificados de HeLa, Vipa y Calo con los oligonucleótidos, MSP10F/R y MSP8F/R, muestras tratadas con proteínasa K (PK) y sin proteínasa K (PKs). Productos correspondientes a la región 5', enhancer y promotor de la LCR.

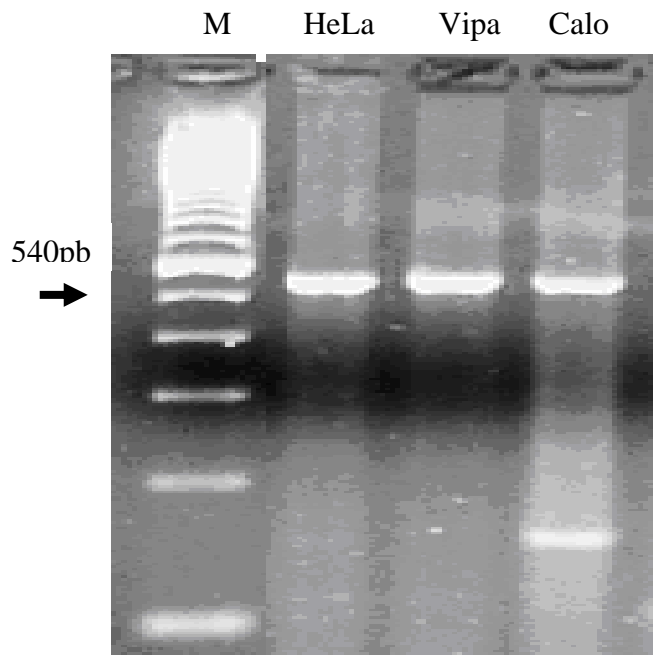


Figura 10. Amplificados de la región 5' del gen L1. Amplificados de ADN modificado de células HeLa, Vipa y Calo con oligonucléidos 18MSP 4F/5R. Productos correspondientes a la región 5' del gen L1.

Posteriormente, los productos de amplificación fueron clonados en bacterias, se dejaron por 24 hrs. a 36° C en incubación, para que crecieran las colonias que fueran positivas a la clonación y se pudiera realizar el análisis correspondiente. Transcurridas las 24 hrs. se observó cuántas clonas de cada producto de amplificación creció, a estas se les realizó una PCR con la finalidad de comprobar que efectivamente fueran positivas a la clonación y tuvieran el fragmento de amplificación incluido en el genoma de la bacteria.

Los productos amplificados se corrieron en geles de agarosa 2% y 80 volts, observándose que la clonación fue exitosa (Figura 11, 12, 13, 14).

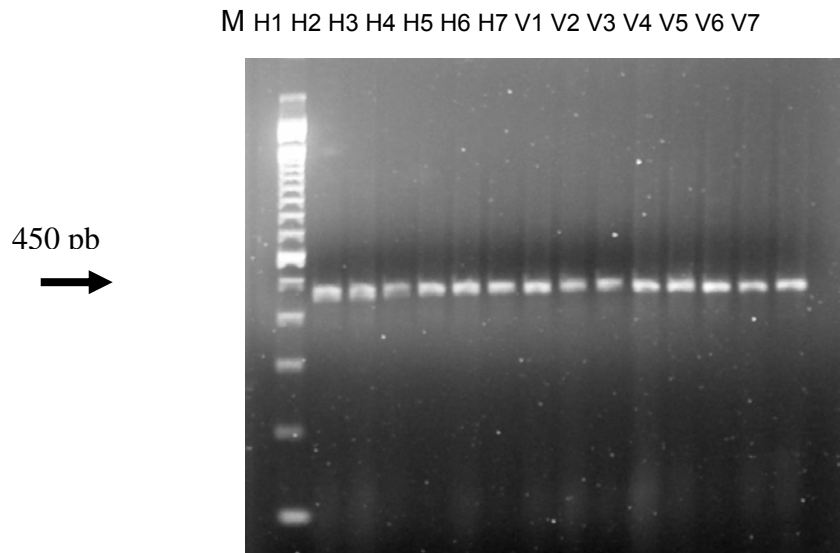


Figura 11. Amplificados de la clonación del promotor de células HeLa y Vipa Amplificados de colonias de la clonación, de productos de PCR de ADN modificado de células HeLa y Vipa con oligonucleótidos M13F/R en el vector TOPO.

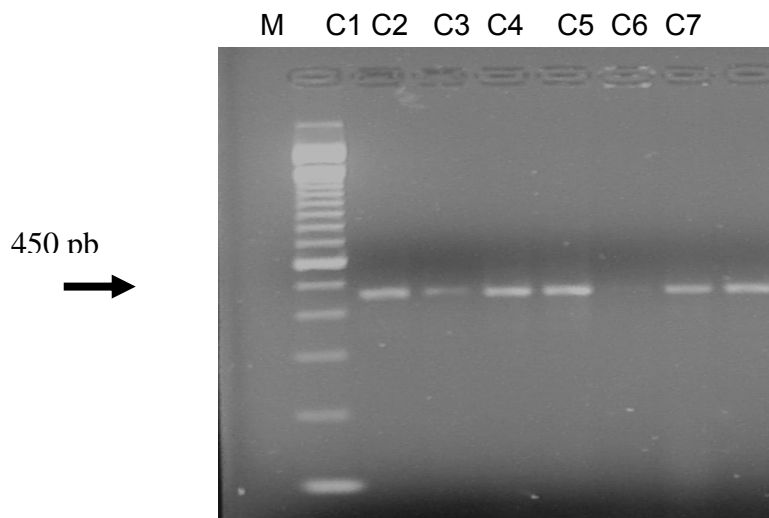


Figura 12. Amplificados de la clonación de la región 5' del gen L1. Amplificados de la clonación de los productos de PCR del ADN modificado de células HeLa, Vipa y Calo de la región 5' del gen L1 con oligonucliótidos M13F/R en el vector TOPO.

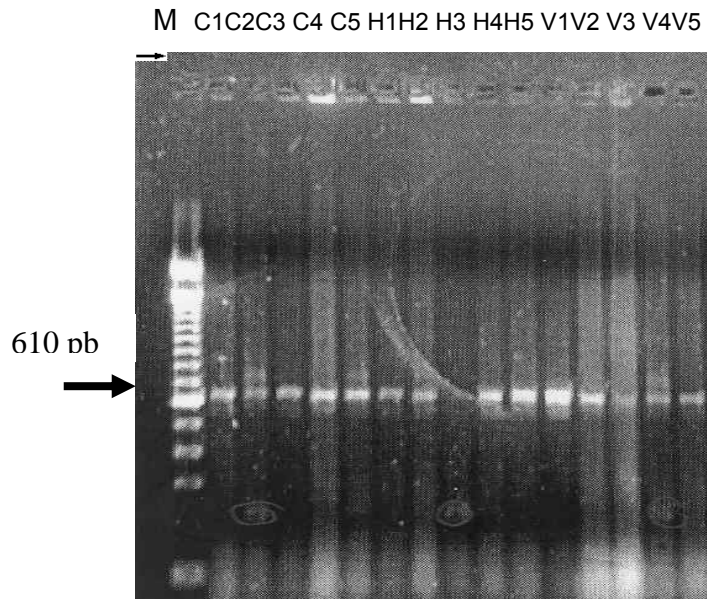


Figura 13. Amplificados de la clonación del promotor y región 5' del gen E6. Amplificados de la clonación de los productos de PCR del ADN modificado de células Calo, HeLa, Vipa oligonucleótidos M13F/R en el vector TOPO.

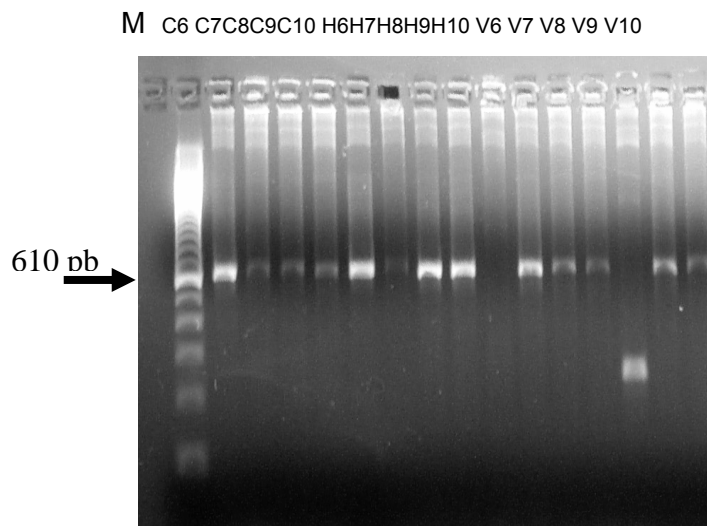


Figura 14. Amplificados de la clonación del promotor y región 5' del gen E6. Amplificados de la clonación de los productos de PCR del ADN modificado de células Calo, HeLa, Vipa oligonucleótidos M13F/R en el vector TOPO.

Una vez corroborado que los productos clonados eran los correctos se limpiaron por el método de EXO-SAP, se realizó una PCR de secuenciación con el kit Big-Dye sequencing, los productos obtenidos se precipitaron con etanol, se desnaturalizaron con formaminda Hi-Di, la reacción de secuenciación se llevó acabo en el secuenciador AB PRISMA 300.

Las secuencias se analizaron por medio del programa Clustalw en Internet, el cual realiza el alineamiento de las secuencias obtenidas con las secuencia de la LCR del Virus del Papiloma Humano que existen en PUBMED. Este alineamiento permitió comparar e identificar las regiones CpG en donde se identificó la presencia o no de metilación (Figuras 15, 16 y 17).

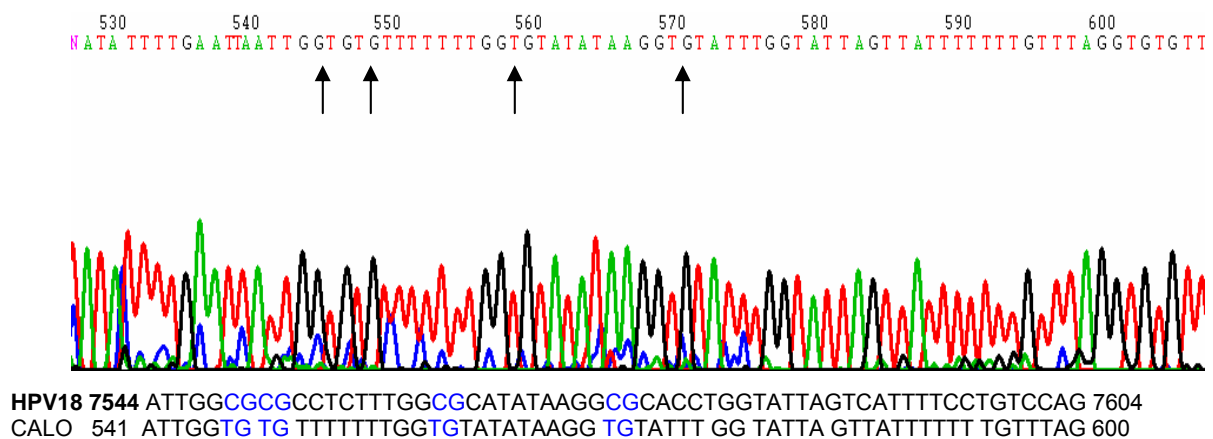


Figura 15. Ausencia de Metilación en el Enhancer de Calo. Secuencia de Calo en donde se muestra el cromatograma, así como su respectivo alineamiento con la secuencia patrón del HPV 18, se puede observar como no existe metilación en la región del enhancer.

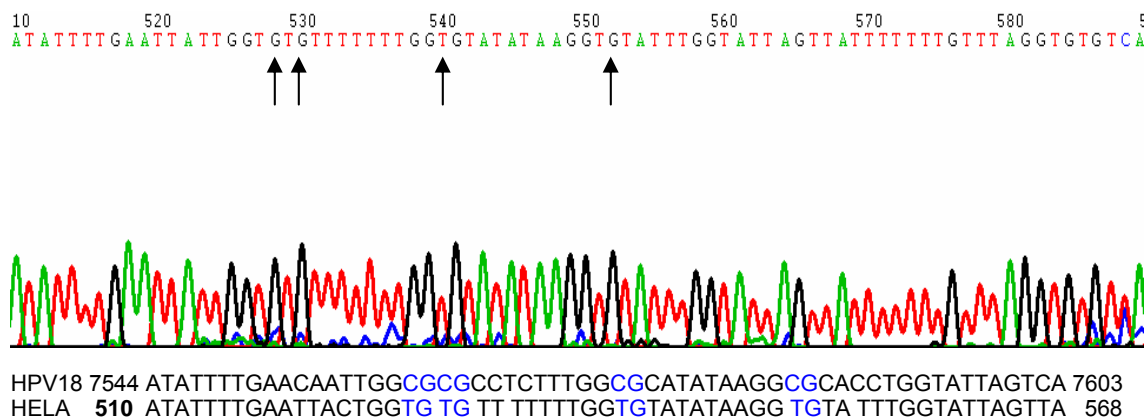


Figura 16. Ausencia de Metilación en le enhancer de HeLa Cromatograma de secuencia de HeLa en donde se muestran los sitios del enhancer en donde no hay metilación y su respectivo alineamiento con la secuencia patrón del HPV 18

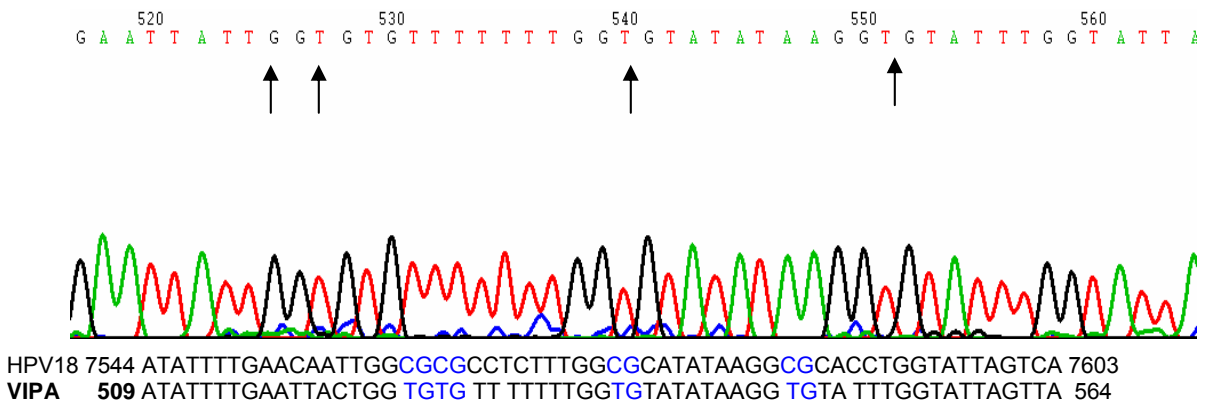


Figura 17. Ausencia de Metilación en el enhancer de ViPa. Cromatograma de la secuencia de Vipa en donde se puede observar los sitios del enhancer en donde no hay metilación y su alineamiento con la secuencia patrón del HPV 18.

Se realizó el análisis de 8 sitios CpG en la región 5' de L1, 15 sitios CpG de la región larga de control (LCR) 3 en la región 5', 6 en el enhancer y 6 en el promotor y 5 de sitios CpG de la región 5' del gen E6, para cada línea celular (HeLa, Vipa, y Calo). Los resultados obtenidos muestran que en la región 5' de gen L1 de Hela el sitio 6039 es el único que no se encuentra metilado, en el caso de Vipa la región 5' de L1 se encuentra parcialmente metilada y en Calo esta región se encuentra completamente metilada.

Para la región larga de control (LCR) se identificó que la posición 7318 es la única que se encuentra metilada en el caso de Vipa y HeLa. Sin embargo en el caso de Calo se encuentra completamente desmetilada. La región 5' de E6 en los tres casos esta completamente desmetilada. Esto se puede ver resumido en la tabla 2 en donde se muestra el análisis global de las 3 líneas celulares.

DISCUSION Y CONCLUSION

La infección viral y la inserción de genes víricos en el genoma de las células inician mecanismos de defensa en el hospedero tales como la activación de la maquinaria de metilación (Verma, 2003). La metilación del ADN es un mecanismo que utilizan las células humanas para desactivar los genes de los organismos invasores, como por ejemplo los virus. Por medio de la modificación química de algunos de los bloques de nucleótidos que conforman el ADN, la metilación impide que la maquinaria celular se una al ADN y coordine la expresión de los genes del virus. Algunos virus pueden encontrar diferentes vías para regular la expresión de genes como la modulación en la metilación del DNA en donde el virus puede silenciar la activación de genes a su favor, para llevar a cabo el establecimiento y persistencia de la infección y evadir la respuesta inmune de la célula hospedera (Tao *et al*, 2003).

La metilación del ADN esta relacionada con la adición de un grupo metilo a los residuos de citosinas, lo cual se puede presentar en cualquier región, sin embargo esto se presenta en los dinucleótidos CpG, esta modificación trae como consecuencia la interferencia de algunos pero no de todos, los factores de transcripción (Harrington *et al*, 1988; Thain *et al*, 1996), y es un paso fundamental en una red compleja de modificaciones en la cromatina en el cual participan activamente las acetilación, desacetilación, metilación de histonas y metilación de citosinas (citosinas) (Bird, 2003). Estas reacciones covalentes modifican a los nucleosomas y dirigen al ADN hacia una transcripción competente o al silenciamiento de la cromatina (Fuks, 2005). Investigaciones en los patrones de metilación en diferentes etapas del cáncer producidos por los HPVs no han proporcionado resultados consistentes y solo han permitido ver algunas tendencias. Algunos estudios se han centrado principalmente en el análisis de la metilación en la LCR esto se debe a la importancia de los elementos en cis que se encuentran localizados en esta región.

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten ver que los patrones de metilación en las diferentes líneas celulares presentan una gran similitud: la región del enhancer y el promotor, en las tres líneas celulares que se estudiaron, está

completamente desmetilado. Sin embargo, el haber encontrado la posición 7318 como una región de metilación en dos líneas celulares (Hela y Vipa), permite determinar que sí existen diferencias entre ellas y abre la posibilidad para continuar investigando y conocer si esta posición es una región clave en el desarrollo de la infección por Virus del Papiloma Humano en células infectadas, debido a que la hipometilación de la LCR favorece la expresión génica de las oncoproteínas E6 y E7.

Por otro lado, el análisis de metilación de la región 5' del gen L1 permitió observar que ésta se encuentra metilada casi en su totalidad en Hela y Calo, sin embargo para el caso de Vipa el patrón de metilación es heterogéneo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Badal y colaboradores quienes encontraron que en las clonas de HeLa la LCR se encuentra desmetilada, con excepción de la posición 7318, mientras que la región L1 se encuentra metilada casi en su totalidad; en el caso de las muestras, la metilación en la región larga de control es heterogénea y la región L1 se encuentra metilada casi en su totalidad.

De manera similar, Turan y colaboradores en el 2006 realizaron investigaciones sobre el estado de metilación del genoma del HPV 18, específicamente en L1, encontrando que en infecciones asintomáticas e infecciones precancerosas o precursoras la LCR del HPV 18 se encontraba no metilado. Sin embargo la región L1 en carcinomas cervicales se encontró fuertemente metilada. Estas evidencias se pueden relacionar también con lo reportado en líneas celulares y muestras con HPV 16, como lo encontrado por Kalantari en el 2004; quien encontró que 10 a 20% de los sitios CpG en la región larga de control (LCR) en muestras de infecciones asintomáticas se encuentran metilados, la metilación disminuye en lesiones precursoras, mientras que en lesiones de alto grado y en carcinomas existe un aumento de metilación. También se encontró que existe una metilación mayor a 50% en la región L1.

Kim y colaboradores, en el 2003, encontraron que existe transición entre la hipermetilación de infecciones asintomáticas e hipometilación en lesiones de bajo grado. Esto se correlacionó con la evidencia de que cultivos de células W12 mantenían el ADN viral de forma episomal hipermetilado cuando se encontraban en un estado no diferenciado, sin embargo cuando éstas se diferenciaban, el ADN pasaba a un estado

de hipermetilación. Con lo cual se apoya la hipótesis de que HPV 16 puede reprimir la transcripción sobre la infección. En procesos iniciales de transformación se ha encontrado no metilación en muestras clínicas (Kalantari *et al*, 2004) y en cultivos celulares (Kim *et al*, 2003). En carcinomas, el ADN del HPV 16 no se encuentra en forma episomal, sino que se integra al ADN celular para su replicación, lo cual se puede correlacionar con un incremento en la metilación (Kalantari *et al*, 2004; Wiley *et al*, 2005), desde que el ADN se integra a los cromosomas celulares es un blanco preferencial para la metilación y la inactivación transcripcional (Doerfler *et al*, 2001).

Esto propone la posibilidad de un mecanismo de reconocimiento específico que lleva la activación selectiva de unos pocos genomas de HPV16 en cada célula para el mantenimiento del estado neoplásico (Van Tine *et al*, 2004). Si bien el HPV 16 es de mayor prevalencia en adenocarcinomas y sobre el cual más estudios se han realizado, es de suma importancia el continuar con investigaciones sobre el HPV18 ya que este se ha asociado con formas más agresivas en las neoplasias intraepiteliales (Schwartz *et al*, 2001; Burk *et al*, 2003).

Todo lo anterior nos permite sugerir que efectivamente la metilación podría actuar como factor de protección cuando está presente reprimiendo la expresión de genes, que favorecen la transformación de las células cuando están infectadas por el virus. Sin embargo esto deja la puerta abierta para seguir realizando investigaciones en este campo y conocer si estos patrones se mantienen en muestras de pacientes de la misma forma que se presentaron en las diferentes líneas celulares.

BIBLIOGRAFIA.

Arenas HF, Recillas TF. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac Méd Méx.* 2002; 138: 547-555.

Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear Factor I and epithelial cell-specific transcriptional of human papillomavirus type 16. *J Virol* 2002 67: 4455-4463.

Badal V, Chuang LSH, Hwee-Hong Tan E, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, *et al*, CpG methylation of human papillomavirus type 16 ADN in clinical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol* 2003; 77: 6227-6234

Badal S, Badal V, Callejas ME, Kalantari M., Chuang LSH, Li BFL, Bernard HU. The Human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular ADN methylation. *Virology* 2004; 324: 483-492.

Baker CC, Phelps WC, Lindergren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cells lines. *J Virol* 1987; 61: 962-967.

Barbosa MS, Vass Wc, Lowy DR, Schiller JT. In Vitro Biological activities of the E6 y E7 genes vary among Pbs. Of different oncogenic potencial. *J Virol* 1992; 65: 292-298).

Bauknecht T, Angel P, Royer H-D. Identification of a negative regulatory domain in the HPV 18 promoter: interaction with the transcriptional repressor YY1. *EMBO J.* 1992; 11: 4607-4617.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer* 2006; 6:107-116.

Bernard. Methylation of the human papillomavirus-18 L1 gene: A biomarker of neoplastic progression? *Virology* 2006; 349: 175-183.

Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations of potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 2002; 7: 219-237.

Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carrancá A. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int. J. Cancer* 1994; 56: 640-645.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 9: 2395-402,

Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA Methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 2002, 18: 275-277

Bhattacharya SK, Tamchandani D, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999; 397: 579-583.

Bird A, Wolffe AP. Methylation induces repression-belts, braces and chromatin. *Cell.* 1999; 24: 451-4.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetics memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.

Brean GL, Ohmstede CA, Phelps Wc, Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *J Virol* 1993; 67: 2655-63

Brown DF, Fan L, Jones J, Bryan J. Colocalization of human papillomavirus type 11 E1 E4 and L1 proteins in human foreskin implants grown in athymic mice. *Virology* 1994; 201: 46-54

Bruk RD, Terai M, Gravbitt P, Brinton LA, Kurman, RJ, Barnes W.A, Greenberg, MD, Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 2003; 63: 7215-7220.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303

Crook T, Storey A, Almond N, Osborn K, Crawford L. Human papillomavirus type 16 cooperates with activated ras and fos oncogenes in the hormone-dependent transformation of primary mouse cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1998; 85: 8820-8824.

Crucius K, Auvinen E, Alonso A. Enhancement of EGF and PMA mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 15 E5 protein. *Oncogene* 1997; 15: 1437-1444.

Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorinez AT. Analysis of physical state of different human papillomavirus ADNs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991; 65: 606-12.

Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol* 1989; 63: 3261-3269.

Chellapan S, Graus VB, Kröner B, Mürger K, Howly PM, Phelps WC, Nevis JR. Adenovirus HA simian virus 40 tumors antigen and human papillomavirus E7 protein share the capacity of disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 4549-4553.

Chiang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human ADN-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target p21WAF21. *Science* 1977; 277: 1996-2000.

De Villiers. E.M, Fauquet, C. Broker, T. R. Bernard, H. U. and zur Hausen. H.. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.

Doerfler W. ADN methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 93-124

Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubbert, R. The fate of foreign ADN in mammalian cells and organisms. *Dev Biol* 2001; 106: 89-97.

Doorbar J, Ely Sm, Sterling J, Mc Lean C, Crawford L. Specific interaction between HPV 16 E1-E4 and cytokeratins results in colapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991; 352: 824-827.

Doorbar J, The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology* 2005; 32S: S7-S15.

Dueñas-Gonzalez A, *et al.* Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer* 2005; 4: 38-62.

Ehrlich M, ADN methylation in cancer; too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21: 5400-5413.

García-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1988; 62: 4321-4330.

García-Carrancá A., P Gariglio. Aspectos moleculares de los papillomavirus humanos y su relación con el cáncer Cervico-uterino. *Rev Inv Clin* 1993; 45: 85-92.

Gius D, Grossma S, Bedell L. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol* 1998; 62: 665-672.

Harrinton MA, Jones PA, Imagawa M, Karim M, Cytosine methylation not affect binding of transcriptional factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2066-2070.

Heck DV, Yee CL, Howley PM, Múnger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoprotein of the human papilloma viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4442-4446

Hidalgo A, Monrroy A, Arana R.M, Taja L, Vázquez G, Salcedo M. Chromosomal imbalances four new uterine. BMC Cancer 2003; 3:1-5.

Hoppe-Seyler F, Butz K, Zur Hausen H. Repression of the human papillomavirus type 18 enhancer by the cellular transcription factor Oct-1. J Virol 1991; 65: 5613-5618.

Jenuwien T, Allis CD. Translating the Histone Code. Science 2001; 293: 1074-1080.

Jones PA, Takai D. The role of ADN methylation in mammalian epigenetics. Science 2001; 293: 1068-1070.

Kafri T, Ariel M, Branderis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. Developmental pattern of gene-specific ADN methylation in the mouse embryo and germ lines. Genes Dev 1992; 6: 705-714.

Kalantari M, Calleja-Macias IE, Tewari D, Hagmar B, Barrera-Saldaña HA. Wiley DJ, Bernard HU. Conserved methylatin patterns of human papillomavirus-16 ADN in asymptomatic infection andenocervical neoplasia. J Virol 2004; 78: 12762-12772.

Lewin B. Genes VIII. Nueva Jersey: Pearson Prentice may, 2004.

Lowy D.R., Howley, P.M. Fields Virology. 4^a ed. Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins 2001; Vol. 1: capitulo 66.

Mack DH., Laimins LA. A Keratinocyte-specific transcription factor KRF, interacts with AP1 to active expression of human papillomavirus type 1 in squamos epitelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 9102-9106

Munger K, Baldwin A, Kirsten M, Edwards, Hayakawa H, Chistine L, Owens M, Miranda G. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. J Virol 2004; 21: 11451-11460.

Muñoz N., Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snidjers PJF, Meijer JLM. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 518-27.

Moskalud C, Bastia D. The E2 gene of bovine papillomavirus encodes an enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 84: 1215-1218.

Nakao M. Epigenetics: Interaction of ADN methylation and chromatin. *Gene* 2001; 278:25-31.

Pater M.M, Glenys. A, Hueeghes, David.E, Hyslop. H. N, y Pater A. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type II human papillomavirus ADN. *Nature* 1988; 335: 832-835.

Pfister H. Human Papillomaviruses and genital cancer. *Adv. Cancer Res.* 1987 48: 113-147.

Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Nat Acad Sci USA* 1977; 74: 2725-2728.

Richards EJ, Elguin SCR. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* 2002; 108: 489-500.

Rodriguez Dorantes M, Ascencio Tellez Nelly, Cerbon A M, Methylation of the ADN: A Epigenetics Phenomenon of Medical Importance. *RIC.* 2004, 56: 56-71.

Romanczuk H, Thierry F, Howley OM. Mutational analysis of the cis-elements involved in E2 repression. *J Virol* 1990; 64: 2849-2859.

Rosl, F., Arab, A., Klevenz, B., Zur Hausen, H. The effect of ADN methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J Gen Virol* 1993; 74: 791-801.

Sawadogo M. RNA polymerase (II) and general transcription factors. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 711-754.

Shwarz E, Freese UK, Gissmann L, *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell. *Nature* 1995; 314: 111-114.

Shwartz, SM, Dalin J, Shera KA, Madeleine MM, McKnigh B. Human papillomavirus and prognosis of invasive cervical cancer: a population based study. *J Clin Oncol* 2001, 19: 1906-1915.

Smith ML, Chen IT, Zahn Q, O'Connor PM. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type ADN damage. *Oncogene* 1995; 10: 1053-1059.

Szyf M. ADN methylation and cancer therapy. *Drug Resistance Updates* 2003; 6: 341-353.

Tao Q, Robetson KD: Stealth technology: how Epstein-Barr virus utilizes ADN methylation to cloak itself from immune detection. *Clin Immunol* 2003; 109: 53-63.

Tolga Turan, Mina Kalantari, Itzel E. Calleja-Macias, Heather A. Cubie, Kate Cischieri, Luisa L. Villa, Hanne Skomedal, Hugo A. Barrera-Saldaña, Han-Ulrich Van Tine, B.A, Kappes, J.C, Baneejee, N.S., Knops, J., Lai, L., Steenbergen, R.D., Meijer, C.L., Snijders, P.J., Chatis P., Broker, T.R., Moen Jr., P.T. Chow, L.T., Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer, *J Virol* 2004; 20: 11172-11186.

Verma M. Viral genes and methylation. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 983: 170-180.

Wade PA. Methyl CpG- binding protein and transcriptional repression. *Bioessays* 2001; 23: 1131-7

Ward P, Coleman DV, Malcolm DB. Regulatory mechanisms of the papillomavirus. *Trends Genet* 1989, 5: 97-99.

Werness, BA., Levine Aj, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 y 18 E6 proteins with p53. Science 1990; 248: 76-79.

White, DO., Fenner, FJ. Medical Virology . 4^a ed. San Diego: Academic Press, 1994: Capitulo 18

Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science 1999, 286: 481-6.

Wolffe AP, Jones PL, Wade PA, ADN demethylation. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; 97: 5135-39.

Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion fram Host-Cell Control in Early events in carcinogenesis. J. of Nat Cancer Institute. 1989; 92: 690-698.