



Título del artículo.

Metilación del gen I1 del VPH-16 como marcador de cáncer cervical.

Título del artículo en idioma Inglés.

Methylation of the I1 gene of HPV-16 as a marker of cervical cancer.

Autores.

Francisco Israel Torres Rojas
Berenice Illades Aguiar

Referencia bibliográfica:

MLA

Torres Rojas, Francisco Israel y Berenice Illades Aguiar. Explorando las bases celulares y moleculares del cáncer: hacia la identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Tlamati* 8.1, (2017): 21-26. Print.

APA

Torres Rojas, F. I., Illades Aguiar, B. (2017). Metilación del gen I1 del VPH-16 como marcador de cáncer cervical. *Tlamati*, 8(1), 21-26.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Metilación del gen I1 del VPH-16 como marcador de cáncer cervical

Francisco Israel Torres Rojas^{1*}
 Berenice Illades Aguiar¹

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Biomedicina Molecular Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.U. Zona Sur. C. P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: + (52) 747 4710901

*Autor de correspondencia
 trisrael5@yahoo.com.mx

Resumen

Se procesaron un total de 14 muestras positivas a infección únicamente por VPH-16, de las cuales 5 fueron diagnosticadas citológicamente como citología normal (CN), 6 como lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y 3 muestras de cáncer. La variante identificada más frecuente en estas muestras fue la variante E-G350. Después de la secuenciación se pudo observar el cambio de citosina a timina en todas aquellas citosinas que no se localizan en el contexto 5' CpG3' y en las citosinas que se encuentran en un dinucleótido CpG pero que carecen de metilación. Las citosinas metiladas se mantienen como citosinas después de la modificación con bisulfito, la mayoría de las muestras con un diagnóstico de citología normal permanecen sin metilación en el fragmento de la región L1 analizada, esta metilación incrementa conforme la lesión progresa. Un hallazgo interesante es que el sitio 6366 carece de metilación en las muestras de LEIBG y en 2 muestras de cáncer, lo que parece indicar que solo los sitios 6388, 6456 y 6580 pueden indicar progresión. También es el hecho de que la muestra portadora de la variante AA-c y diagnosticada como LEIBG, presenta un mayor grado de metilación que el resto de las muestras catalogadas en el mismo grupo de lesión, lo anterior puede ser consecuencia de la alta capacidad de progresión a cáncer que se le ha atribuido a mencionada variante, aunque cabe señalar que la muestra de cáncer portadora de esta variante no presenta metilación en la posición 6366.

Palabras clave: cáncer, lesión escamosa. VPH

Abstract

A total of 14 infection-positive samples were processed only for HPV-16, of which 5 were cytologically diagnosed as normal cytology (CN), 6 as a low-grade squamous intraepithelial lesion (LEIBG) and 3 cancer samples. The most frequent variant identified in these samples was the variant E-G350. After sequencing, change of cytosine to thymine could be observed in all those cytosines that are not located in the 5' CpG3' context and in the cytosines that are found in a CpG dinucleotide but lack methylation. Methylated cytosines remain as cytosines after modification with bisulfite, most of the samples with a normal cytology diagnosis remain without methylation in the fragment of the L1 region analyzed; this methylation increases as the lesion progresses. An interesting finding is that the 6366 site lacks methylation in the LEIBG samples and in 2 cancer samples, which seems to indicate that only the 6388, 6456 and 6580 sites may indicate progression. It is also a fact that the carrier sample of the variant AA-c and diagnosed as LEIBG, presents a higher degree of methylation than the rest of the samples cataloged in the same group of lesion; this may be a consequence of the high capacity of progression to cancer that has been attributed to this variant, although it should be noted that the cancer sample carrying this variant does not present methylation at position 6366.

Keywords: cancer, squamous lesion. HPV

Como citar el artículo:

Torres Rojas, F. I., Illades Aguiar, B. (2017). Metilación del gen I1 del VPH-16 como marcador de cáncer cervical. *Tlamati*, 8(1), 21-26.

Introducción

El Virus de Papiloma Humano (VPH) es el agente causal del Cáncer Cérvico Uterino e infecciones anogenitales; además ha sido detectado en tumores extragenitales como en oral, esófago, laringe y pulmón (Amarante y Watanabe, 2009). El genoma viral se divide en tres regiones: región larga de control (LCR), región temprana y región tardía. La LCR es una región no codificante donde se localiza el sitio de origen de la replicación, así como los sitios de unión de factores de transcripción. La región temprana incluye 6 fragmentos de lectura abiertos (ORF) E1-E7. La región tardía se conforma por dos genes que codifican para la cápside viral, L1 y L2. Estas regiones están en todos los papilomavirus y están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): sitios pA temprano (AE) y pA tardío (AL). En la LCR se encuentra el promotor p97, responsable de la expresión de los genes tempranos; p670 es el promotor tardío, regulador de la expresión de los genes tardíos (Dueñas, Lizano, Candelaria, Cetina, Arce, y Cervera,

2005; Zheng y Baker, 2006).

La integración del genoma de los VPH-AR al genoma hospedero se considera un evento importante en la progresión del CaCU y otros tipos de cáncer anogenitales, se han reportado evidencias de que la integración del genoma viral al genoma celular es un evento clave en la progresión de las lesiones precancerosas a CaCU (Arias, Peyton, Joste, Vargas y Wheeler, 2006; Vinokurova, Wentzensen, Kraus, Klaes, Driesch, Melsheimer, Kissel'jov, Dürst, et al. 2008).

La metilación es un fenómeno fisiológico en la regulación de la expresión de los genes, siendo de vital importancia para mantener el silenciamiento genético (Salozhin, Prokhorchuk, y Georgiev, 2005).

Estudios que han evaluado la metilación en el genoma del VPH-16, han descrito que la metilación en muestras derivadas de carcinoma, lesiones precancerosas, infecciones asintomáticas y líneas celulares cancerosas y precancerosas varían entre un 3 y 20% (Badal, Chuang, Tan, Badal, Villa, Wheeler, Li y Bernard., 2003; Kalantari, Calleja-

```
Comparison of:
(A) ./www.tmp/.16129.1.seq Refere 7905 bp - 7905 nt
(B) ./www.tmp/.16129.2.seq L1M 238 bp - 238 nt
using matrix file: DNA (5/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

97.1% identity in 238 nt overlap (7495-7732:1-238); score: 1127 E(10000): 2.9e-85

6420 6430 6440 6450 6460 6470

Refere TAAATAGTTTTATGTTAGTAATTATGGTTAAATTTGTACGTTTTTGTGGTATG
          :::::::::::::::::::::::::::::
TTAATAGTTTTATGTTAGTAATTATGTTAAATTTGTATGTTTTTGTGGTATG
    10   20   30   40   50   60
```

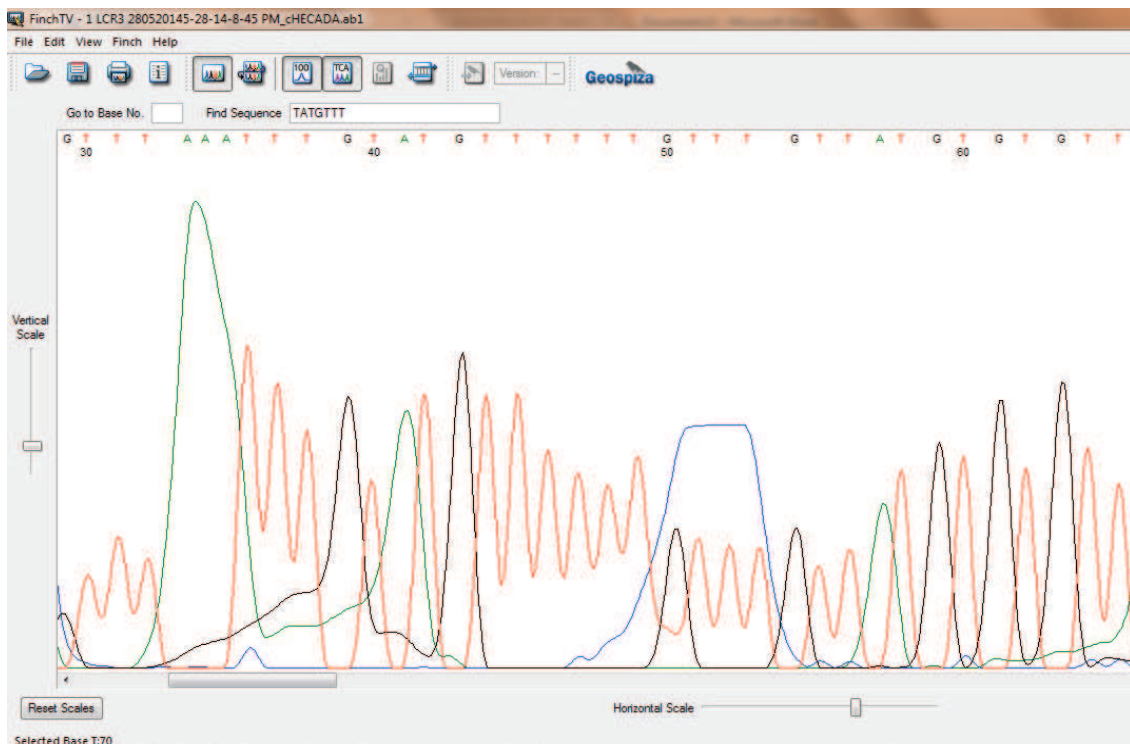


Figura 1. Identificación de sitios CpG no metilados

Tabla 1. Variantes del VPH-16 localizadas en las muestras.

Clave de la muestra	Cambio Nucleotídico respecto a la variante Prototipo	Variante
CQ129	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ771	Timina por Guanina posición 350	E-G350
TH805	Timina por Guanina posición 350	E-G350
TH90	G145T, T183G, T286A, A289G, C335T, T350G y A532G	AA-c
CQ359	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ2971	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ2308	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ2545	G145T, T183G, T286A, A289G, C335T, T350G y A532G	AA-c
MC1	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ3544	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CQ1239	Guanina por Adenina posición 176	E-A176/g
CC80	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CC186	Timina por Guanina posición 350	E-G350
CC188	G145T, T286A, A289G, C335T, T350G y A532G	AA-a

Macias, Tewari, Hagmar, Lie, Barrera-Saldana, Wiley y Bernard 2004).

En un estudio realizado por Brandsma y colaboradores donde se evaluó la metilación del ADN del VPH-16, se encontró una alta frecuencia de metilación en sitios CpG en particular en el gen *E5* y región *L2/L1*. De este modo la progresión neoplásica se asoció generalmente con un número creciente de sitios CpG metilados y al aumento de la proporción de moléculas de VPH-16 metilados en estas regiones (Brandsma, Sun, Lizardi, Tuck, Zelterman, Haines, Martel, Harigopal, Schofield y Neapolitano 2009).

Recientemente se ha reportado que la metilación en el gen *L1* del VPH-16 se asocia positivamente con el diagnóstico histológico (Oka, Kajita, Nishimura, Ohbayashi y Sudo, 2013).

Nosotros intentamos demostrar que la determinación de la metilación en 4 sitios de *L1* puede ser un factor clave para identificar el diagnóstico citológico y el riesgo de progresión a cáncer en lesiones precursoras.

Materiales y Métodos

Obtención de muestras

La recolección de muestras y el diagnóstico citológico, fueron realizadas por el servicio de diagnóstico oportuno de CaCU y detección de VPH en el Laboratorio de Citopatología e Histoquímica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas [UACQB] de la Universidad Autónoma de Guerrero [UAGro].

Se obtuvieron muestras exo-endocervicales de la zona de transformación escamo cilíndrica de mujeres que acudieron a mencionado servicio de detección.

Las muestras de cáncer fueron captadas en el Instituto

Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”

Extracción de ADN genómico

El ADN fue extraído mediante el método estándar SDS-proteinasa K-fenol-cloroformo. Brevemente, se agregará proteinasa K hasta una concentración final de 100ug/ml y se incubó a 65°C durante 20 minutos. Se agregó la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico [25:24:1] y se centrifugó para recuperar la fase acuosa. Lo anterior se realizó por 3 veces. Se agregó cloroformo/alcohol isoamílico [24:1], se centrifugó y recuperó la fase acuosa a la cual se agregó LiCl, nuevamente se centrifugó y recuperó el sobrenadante. El ADN se precipitó agregando NaCl 5M e isopropanol agitando lentamente, por inversión. El ADN se incubó a -20°C toda la noche para posteriormente realizar un lavado con etanol al 70%, se centrifugó y desechó el sobrenadante. Una vez seco, el ADN fue resuspendido en agua desionizada.

Determinación de la variante del VPH

El diagnóstico citológico fue realizado por citología en base líquida en el Laboratorio de Citopatología de la UACQB y la tipificación viral por INNO-LiPA HPV genotyping Extra.

La identificación de variantes del VPH-16 se realizó mediante secuenciación de productos de PCR positivos al gen E6 del VH-16, dichos fragmentos fueron obtenidos con el uso de los iniciadores F048 (5'GAACCGAAACCGGTTAGTAT3') y R622 (5'CAGTTGTCTCTGGTTGCAA3'), las condiciones de PCR fueron las descritas por Casas, Galván, Ordoñez, López, Guido y Berumen en 2009, el producto de PCR fue marcado y secuenciado mediante Big Dye Terminator v3.1

Comparison of:

(A) ./www.tpm/16128.1.seq unknown 7905 bp reference - 7905 nt

(B) ./www.tpm/16128.2.seq unknown 270 bp l1m
using matrix file: DNA (5/-4), gap-open/ext: -14/-4 E(limit) 0.05

99.6% identity in 264 nt overlap (6364-6627:6-269); score: 1311 E(10000): 1.5e-100

6370 6380 6390 6400 6410 6420

reference GCGGATAGTTATTTTTTTATTGATCGGGGAGGT

.....

l1m GCGGATAGTTATTTTTTTATNGATCGGGGNGGT

50 60 70

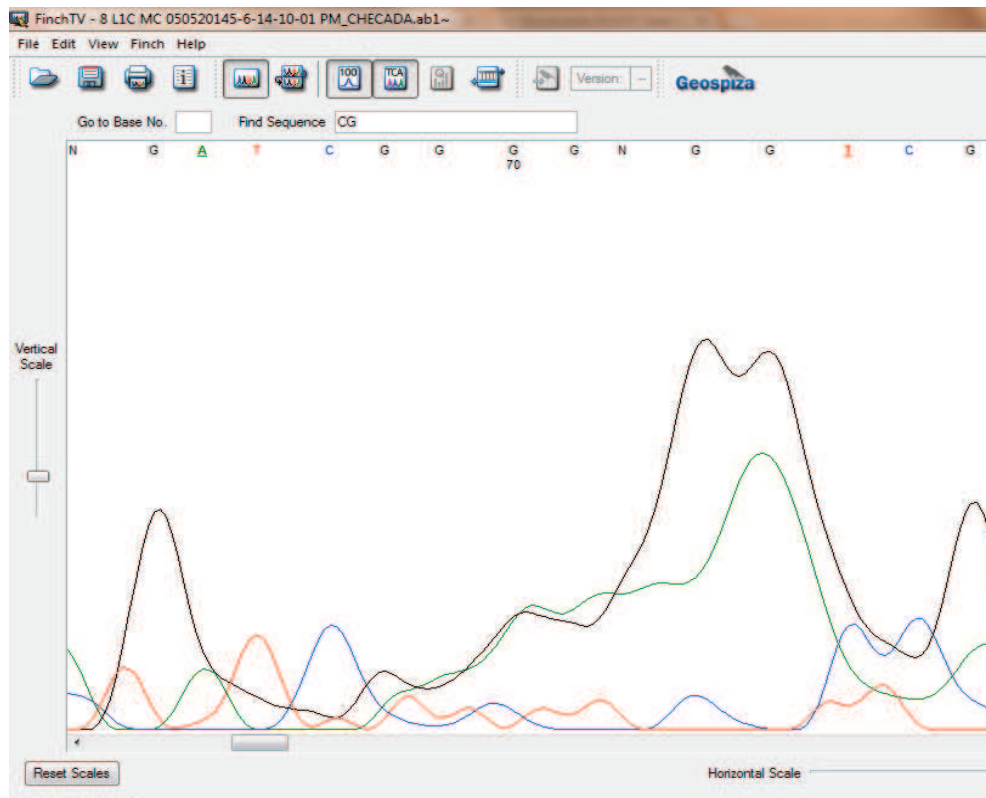


Figura 2. Identificación de sitios CpG metilados

Ready Reaction Kit, Applied Biosystems en un secuenciador automático de DNA ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Una vez obtenida la secuencia se hizo BLAST utilizando *Standard Nucleotide BLAST* (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2014) de acuerdo al alineamiento obtenido se revisaron los cambios nucleotídicos en base a lo reportado por Cornet, Gheit, Franceschi, Vignat, Burk, Sylla, Tommasino, Clifford, et al. en 2012 y se clasificó a la variante.

Determinación de la metilación del gen L1 del VPH-16

Se realizó modificación de 1 µg de ADN con bisulfito de sodio utilizando el KIT EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, posteriormente y utilizando los iniciadores específicos para ADN modificado los cuales son dirigidos específicamente a la región comprendida entre los nucleótidos xxxxx y xxxxx del genoma del VPH-16. Se utilizó el siguiente

programa de amplificación: 94°C x 10 minutos, 94°C x 30 segundos, 54°C x 30 segundos, 72°C x 30 segundos por 40 ciclos, 72°C x 7 minutos y una temperatura final de 4°C. Los productos de PCR positivos fueron purificados mediante precipitación con Isopropanol al 75% para posteriormente ser secuenciados mediante el método fluorescente de secuenciación en ciclo (Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Kit, Applied Biosystems) usando los mismos iniciadores específicos.

La mezcla del marcaje y las condiciones del ciclaje usadas fueron: 94°C 3 min; 96°C 30 seg; 50°C 25 seg; 72°C 2min por 25 ciclos.

Posterior al marcaje se realizó una segunda repurificación utilizando el método de precipitación por Isopropanol 75%. La secuenciación fue realizada en un secuenciador automático de ADN ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) por duplicado.

Tabla 2. Metilación del gen *L1* en muestras positivas a VPH-16

CLAVE	Dx Cit	Var	Sitio_6366	Sitio_6388	Sitio_6456	Sitio_6580
CQ129	CN	E-G350	U	U	U	U
CQ771	CN	E-G350	U	U	U	U
TH805	CN	E-G350	U	M	M	U
TH90	CN	AA-c	U	U	U	M
CQ359	CN	E-G350	U	U	U	U
CQ2971	LEIBG	E-G350	U	M	U	U
CQ2308	LEIBG	E-G350	U	M	U	U
CQ2545	LEIBG	AA-c	M	M	UM	M
MC1	LEIBG	E-G350	U	M	U	M
CQ3544	LEIBG	E-G350		UM	U	U
CQ1239	LEIBG	E-A176/g	U	M	U	U
CC80	Cáncer	E-G350	U	M	M	M
CC186	Cáncer	E-G350	U	M	M	M
CC188	Cáncer	AA-a	U	M	M	M

Resultados

Se procesaron un total de 14 muestras positivas a infección únicamente por VPH-16, de las cuales 5 fueron diagnosticadas citológicamente como citología normal (CN), 6 como lesión escamosa intraepitelial de bajo grado (LEIBG) y 3 muestras de cáncer.

Las variantes identificadas en estas muestras se enlistan en la tabla 1, siendo la variante más frecuente la variante E-G350.

Después de la secuenciación se pudo observar el cambio de citosina a timina en todas aquellas citosinas que no se localizan en el contexto 5' CpG3' y en las citosinas que se encuentran en un dinucleótido CpG pero que carecen de metilación (véase figura 1).

Las citosinas metiladas se mantienen como citosinas después de la modificación con bisulfito, esto sólo puede observarse en la secuenciación (véase figura 2).

Como puede observarse en la tabla 2, la mayoría de las muestras con un diagnóstico de citología normal permanecen sin metilación en el fragmento de la región L1 analizada, esta metilación incrementa conforme la lesión progresa.

Discusión y conclusiones

Un hallazgo interesante es que el sitio 6366 carece de metilación en las muestras de LEIBG y en 2 muestras de cáncer, lo que parece indicar que solo los sitios 6388, 6456 y 6580 pueden indicar progresión.

Un punto más a recalcar es el hecho de que la muestra portadora de la variante AA-c y diagnosticada como LEIBG, presenta un mayor grado de metilación que el resto de las muestras catalogadas en el mismo grupo de

lesión, lo anterior puede ser consecuencia de la alta capacidad de progresión a cáncer que se le ha atribuido a mencionada variante, aunque cabe señalar que la muestra de cáncer portadora de esta variante no presenta metilación en la posición 6366.

La importancia de la metilación en L1 ha sido previamente descrita como un indicador de integración viral y de progresión, como nosotros en este estudio lo podemos corroborar, sin embargo es importante señalar, que aun no existe un estudio que ponga de manifiesto el efecto de mencionada metilación en la expresión de oncoproteínas virales o en la interacción de factores de la transcripción con la región L1 del genoma del VPH-16.

La metilación en otras regiones del genoma del VPH-16 debe ser analizada en busca de encontrar una homogeneidad más concreta en cuanto a metilación del virus en la progresión del cáncer cérvicouterino lo cual, hasta ahora, no ha podido ser logrado.

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación "Identificación de un panel de Biomarcadores en Cáncer Cérvico Uterino" financiado por el Fondo Sectoriales Mixtos bajo el numero 201579.

Referencias

- Amarante, M. K. y Watanabe, M. A. (2009). The possible involvement of virus in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135, 329-337
- Arias, H., Peyton, C., Joste, N. Vargas, H. y Wheeler, C. M. (2006). Human Papillomavirus Type 16 Integration in Cervical Carcinoma In Situ and in Invasive Cervical

- Cancer. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1755-1762.
- Badal, V., Chuang, L. S. H., Tan, E. H., Badal, S., Villa, L. L., Wheeler, C. M., Li, B. F. y Bernard, H. U. (2003). CpG methylation of human papillomavirus-16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *Journal of Virology*, 77, 6227-6234.
- Brandsma, J., M. (2009). Distinct Human Papillomavirus Type 16 Methyomes in Cervical Cells at Different Stages of Premalignancy. *Virology*, 389(1-2), 100-107
- Casas, L., Galván, S. C., Ordoñez, R. M., López, N., Guido, M., y Berumen, J. (1999). Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *International Journal of Cancer*, 83(4), 449-455.
- Cornet, I., Gheit, T., Franceschi, S., Vignat, J., Burk, R. D., Sylla, B. S., Tommasino, M., Clifford, G. M., y the IARC HPV Variant Study Group. (2012) Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. *Journal of Virology*, 86 (12), 6855-6861.
- Dueñas, A., Lizano, M., Candelaria, M., Cetina, L., Arce, C., y Cervera, E. (2005). Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Molecular Cancer*, 4 (25), 1-24
- Kalantari M., Calleja-Macias, I. E., Tewari, D., Hagmar, B., Lie, K., Barrera-Saldana, H.A., Wiley, D.J. y Bernard, H. U. (2004). Conserved Methylation Patterns of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Asymptomatic Infection and Cervical Neoplasia. *Journal of Virology*, 78 (23), 12762-12772
- National Center for Biotechnology Information (2014). *Standard Nucleotide BLAST*. Obtenido de http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PRO-GRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO C=blasthome
- Oka, N., Kajita, M., Nishimura, R., Ohbayashi, C., Sudo, T. (2013). L1 Gene Methylation in High-Risk Human Papillomaviruses for the Prognosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer*, 23, 235-243.
- Salozhin, S., Prokhorchuk, E. y Georgiev, G., (2005). Methylation of DNA One of the Major Epigenetic Markers. *Biochemistry*, 70(5), 526-528.
- Vinokurova S., Wentzensen N., Kraus I. Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Dürst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M. (2008). Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research*, 68, 307-313.
- Zheng, Z. M. y Baker, C. C. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2286-302.